



seit 1558

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Physikalisch-Astronomische Fakultät
Institut für Angewandte Optik

WEITFELDMIKROSKOPIE UNTER VERWENDUNG EINES BILDINVERTIERENDEN INTERFEROMETERS

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der
Physikalisch-Astronomischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Phys. Daniel Weigel
geboren am 29.09.1984

Gutachter

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Richard Kowarschik
2. Prof. Dr. sc. nat. Wolfgang Osten
3. Prof. Dr.-Ing. Herbert Gross

Tag der Disputation

23.11.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Symbolverzeichnis	v
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Optische Abbildung im Mikroskop	3
2.1.1 Blenden und Pupillen	3
2.1.2 Ento- und telezentrische Abbildungen	4
2.1.3 Weitfeldmikroskop mit Köhlerscher Beleuchtung	5
2.1.4 Punktbildverwaschungsfunktion	6
2.1.5 Auflösungsvermögen und Schärfentiefe	8
2.2 Charakterisierung der Aberrationen optischer Systeme	9
2.2.1 Strehl-Verhältnis	9
2.2.2 Zernike-Polynome	10
2.3 Kohärenz	12
2.3.1 Kohärenzfunktion	12
2.3.2 Zeitliche und räumliche Kohärenz	14
2.3.3 Propagation der räumlichen Kohärenzfunktion	15
3 Messung der komplexen Kohärenzfunktion	17
3.1 Shearing-Interferometrie	17
3.1.1 Lateral-Shearing-Interferometer	18
3.1.2 Radial-Shearing-Interferometer	18
3.1.3 Rotations-Shearing-Interferometer	19
3.1.4 Maximaler Korrelationsabstand	20
3.2 Mögliche Realisierungen eines bildinvertierenden Interferometers . .	22
3.3 Bestimmung der komplexwertigen räumlichen Kohärenzfunktion . .	24
3.3.1 Quasi-monochromatischer Fall	24
3.3.2 Polychromatischer Fall	25
3.4 Zusammenfassung	27
4 Laboraufbau des bildinvertierenden Interferometers	29
4.1 Charakterisierung der Systemfehler	30
4.2 Numerische Korrektur der Systemfehler	33
5 Weitfeldbildinversionsmikroskopie	37
5.1 Abbildungseigenschaften eines Weitfeldbildinversionsmikroskops . .	37
5.1.1 Vorbetrachtung	37

5.1.2	Theoretische Behandlung	40
5.2	Versuchsaufbau	45
5.3	Abbildung zweidimensionaler Objekte	46
5.3.1	Laterale Punktbildverwaschungsfunktion	47
5.3.2	Phasenkorrektur im Bildfeld	48
5.3.3	Zwei-Punkt-Auflösung	50
5.4	Einfluss von Abbildungsfehlern	52
5.4.1	Auswirkung von Aberrationen auf die interferometrische OTF	53
5.4.2	Numerische Aberrationskorrektur	54
5.4.3	Experimenteller Nachweis	55
5.5	Erweiterte Schärfentiefe	59
5.5.1	Kriterium zur Quantifizierung der Schärfentiefe	60
5.5.2	Experimentelle Bestimmung der erweiterten Schärfentiefe	62
5.6	Rekonstruktion dreidimensionaler Objektstrukturen	70
5.6.1	Tiefenabhängiger Abbildungsmaßstab	70
5.6.2	Perspektive der Objektrekonstruktion	74
5.6.3	Aufnahme einer dreidimensionalen Struktur	76
5.7	Verwendung polychromatischen Lichts	78
5.7.1	Spektrale Darstellung von Objekten	79
5.7.2	Einfluss der Kohärenzlänge auf die interferometrische PSF	81
5.8	Bildrauschen	89
5.8.1	Anforderung an den Detektor	89
5.8.2	Signal-Rausch-Verhältnis	90
6	Zusammenfassung	97
	Anhang	101
	Literaturverzeichnis	117
	Ehrenwörtliche Erklärung	129
	Eigene Publikationen	131
	Danksagung	135

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
A	Apertur
AB	Aperturblende
AE	Airy-Einheiten
AP	Austrittspupille
BII	Bildinvertierendes Interferometer
CCD	Charge-Coupled Device
DE	Detektorebene
DP	Dove-Prisma
DPI	Dove-Prismen-Interferometer
DST	Dichroitischer Strahlteiler
EP	Eintrittspupille
F	Filter
FB	Feldblende
FWC	Elektronenspeicherkapazität (Full Well Capacity)
GB	Gesichtsfeldblende
GL	Glühlampe
HeNe	Helium-Neon-Laser
HWB	Halbwertsbreite
I ⁵ M	Incoherent Interference Illumination Image Interference Microscopy
iPALM	Interferometric Photoactivated Localization Microscopy
IMTF	Interferometrische Modulationstransferfunktion
IOTF	Interferometrische optische Übertragungsfunktion
IPSF	Interferometrische Punktbildverwaschungsfunktion
K	Kollimator
KF	Klebstofffilm
Ko	Kondensor
KP	Kompensationsplatte
L	Linse
LCD	Liquid Crystal Display
LED	Leuchtdiode (Light-Emitting Diode)

MO	Mikroskopobjektiv
MTF	Modulationstransferfunktion
NA	Numerische Apertur
oA	Optische Achse
oE	Optische Einheit
OE	Objektebene
OR	Objektraum
OTF	Optische Übertragungsfunktion (Optical Transfer Function)
PA	Piezo-Aktuator
PALM	Photoactivated Localization Microscopy
PSF	Punktbildverwaschungsfunktion (Point Spread Function)
PTF	Phasentransferfunktion
PV	Peak-to-Valley-Abweichung
Q	Quelle
RadSI	Radial-Shearing Interferometer
RE	Rayleigh-Einheiten
RMSE	Root-Mean-Square Error
RP	Rechtwinkliges Prisma
RSI	Rotations-Shearing-Interferometer
S	Schirm
SIM	Structured Illumination Microscopy
SM	Schrittmotor
SP	Spiegel
SRV	Signal-Rausch-Verhältnis
ST	Strahlteiler
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
STW	Strahlteilerwürfel
SV	Strehl-Verhältnis
TC	Testchart
wE	Willkürliche Einheit
WIIM	Weitfeldbildinversionsmikroskopie (Widefield Image Inversion Microscopy)
VCZT	Van-Cittert-Zernike-Theorem
ZB	Zwischenbild

Symbolverzeichnis

A	Apodisationsfunktion
b	Bildweite
B	Bilderstapel
c	Lichtgeschwindigkeit
C	Skalarer Vorfaktor
c_n^m	Zernike-Koeffizient
d	Abstand
D	Durchmesser
E	Elektrische Feldstärke
f	Brennweite
F	Fläche
$\mathcal{F}\{\cdot\}$	Fouriertransformation
g	Gegenstandsweite
\mathcal{G}	Ortsfrequenzspektrum
i	Imaginäre Einheit
I	Intensität (Strahlungsleistung pro Fläche)
J	Anzahl der aufgenommenen Interferogramme
J_1	Bessel-Funktion erster Gattung und erster Ordnung
K	Propagator
l_c	Kohärenzlänge des Lichts
m	Azimutale Ordnung der Zernike-Polynome Z_n^m
M	Abbildungsmaßstab
n	Radiale Ordnung der Zernike-Polynome Z_n^m
n	Brechzahl des Mediums
N_n^m	Normierungsfaktor der Zernike-Polynome Z_n^m
p	Skalarer Vorfaktor
px	Pixelabstand auf dem CCD-Sensor
\mathcal{P}	Pupillenfunktion
P	Punkt im Raum
q	Skalarer Vorfaktor
Q	Multiplikator
r	Betrag des Ortsvektors \mathbf{r}
\mathbf{r}	Ortsvektor
R	Radius
$R_n^{ m }$	Radiales Zernike-Polynom
$\Re\{\cdot\}$	Realteil einer komplexen Funktion
\mathbf{s}	Ortsvektor
S	Spektrum des Lichts (Spektrale Intensität)

t	Zeit
T	Integrationszeit
T_A	Amplitudentransmissionsfunktion
u	Axiale optische Koordinate
v	Laterale optische Koordinate
V	Sichtbarkeit / Kontrast der Interferenzstruktur
w	Hauptstrahlwinkel
x, y	Laterale Koordinaten
s_x, s_y	Laterale Koordinaten
z	Axiale Koordinate
Z_n^m	Zernike-Polynom
α	Aperturwinkel / Öffnungswinkel
β	Winkel in Vektordarstellung (β_x, β_y) mit dem Betrag β
γ	Komplexer Kohärenzgrad
Γ	Komplexe Kohärenzfunktion
δ_{mn}	Kronecker-Delta
$\delta(\cdot)$	Delta-Distribution
$\delta\phi$	Größe eines Phasenschrittes
$\delta\zeta$	Abstand der Sampling-Punkte eines Interferogramms
$\Delta\zeta$	Optische Weglängendifferenz zwischen den Interferometerarmen
$\Delta\lambda$	Halbwertsbreite des Spektrums $\mathcal{S}(\lambda)$
δr	Laterales Auflösungsvermögen
Δr	Korrelationsabstand $(\Delta \mathbf{r})$
$\Delta \mathbf{r}$	Korrelationsvektor / Differenzvektor
$\overline{\delta\Phi^2}$	Mittlere quadratische Abweichung der Aberrationsfunktion von der Referenzwelle
$\Delta\Phi$	Interferometrische Aberrationsfunktion
$\overline{\Delta\Phi^2}$	Mittlere quadratische Abweichung der interferometrischen Aberrationsfunktion von der Referenzwelle
$\Delta\omega$	Halbwertsbreite des Spektrums $\mathcal{S}(\omega)$
δz	Schärfentiefe
Δz	Abstand zur Fokusebene
ΔZ	Axiale Ausdehnung einer Objektstruktur
ε	Dielektrizitätskonstante
ϑ	Phasenfunktion des Kohärenzgrades γ
θ	Polarwinkel
κ	Normierungsfaktor
λ	Wellenlänge des Lichts
$\bar{\lambda}$	Mittlere Wellenlänge

Λ	Periodenlänge der Interferenzstreifen
\mathbf{v}	Ortsfrequenzvektor (v_x, v_y)
ξ, η	Laterale Koordinaten
ρ	Radialer Abstand (Polarkoordinate)
$\boldsymbol{\rho}$	Ortsvektor (ρ_x, ρ_y) mit dem Betrag ρ
Σ	Ebene im Raum
τ	Laufzeitdifferenz
φ	Phasenlage eines Interferenzmusters
ϕ	Phasenfunktion der Kohärenzfunktion Γ
Φ	Aberrationsfunktion
χ	Phasenfunktion
ψ	Azimutwinkel
Ψ	Shearwinkel
ω	Kreisfrequenz des Lichts
Ω	Statistisch variierende Phasenfunktion

1 Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten kam es im Bereich der medizinischen und biologischen Forschung zu bedeutenden Fortschritten, welche ohne den Einsatz hochauflösender optischer Mikroskope nicht denkbar gewesen wären. Die Optimierung bestehender Techniken und die Entwicklung neuer Methoden ist daher ein wichtiger Forschungsschwerpunkt. Während Verfahren wie die 4Pi-Mikroskopie [1, 2] oder I⁵M [3, 4] vorwiegend das axiale Auflösungsvermögen verbessern konnten, wurden Techniken wie PALM [5, 6] oder STORM [7] entwickelt, um das laterale Auflösungsvermögen optischer Mikroskope zu erhöhen. Mithilfe von STED [8], SIM [9, 10] oder iPALM [11] gelang es, das Abbesche Beugungslimit [12] in allen drei Raumdimensionen deutlich zu unterschreiten.

Es existieren jedoch auch Anwendungen, bei welchen die Tiefeninformationen nicht von Interesse sind und stattdessen die Projektion einer dreidimensionalen (3D) Szene in ein zweidimensionales (2D) Bild wünschenswert ist. Hier wären beispielsweise die Beobachtung und Verfolgung einzelner Zellbestandteile, Untersuchungen im Rahmen der Durchflusszytometrie oder die Fertigungskontrolle von Halbleiterschaltkreisen und LCD-Displays zu nennen. Eine Möglichkeit, solche 2D-Projektionen zu erstellen, besteht darin, Bilder aus verschiedenen Ebenen eines Objekts aufzunehmen und diese mittels geeigneter Algorithmen [13–15] zu verarbeiten. Hierfür muss allerdings die Probe, oder das Mikroskop selbst, mehrfach in axialer Richtung bewegt werden, was diese Technik zeitaufwendig und stör anfällig macht. Ein weiterer Ansatz nutzt beispielsweise spezielle, zumeist kubische, Phasenplatten, um die axiale Ausdehnung der Punktbildverwaschungsfunktion des abbildenden Systems zu vergrößern [16]. Die damit erreichbare Schärfentiefe ist bis jetzt jedoch auf das ca. 10- bis 20-Fache eines vergleichbaren, konventionellen Systems beschränkt [17, 18]. Neben diesen Weitfeldverfahren existieren auch Ansätze, die Schärfentiefe unter Verwendung scannender Techniken zu erweitern. Eine Möglichkeit stellt hierbei die Beleuchtung der Probe mit einem Besselstrahl [19] dar. Dieser hat zwar eine große axiale Ausdehnung, aufgrund seiner lateralen Struktur eignet er sich jedoch vor allem für den Einsatz in der Zweiphotonenmikroskopie [20] oder in Verbindung mit einem Rotations-Shearing-Interferometer [21, 22].

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein neuer Ansatz vorgestellt, welcher die Aufnahme mikroskopischer Objekte mit theoretisch unendlicher Schärfentiefe ermöglicht. Dadurch sind 2D-Projektionen dreidimensionaler Intensitätsverteilungen realisierbar, ohne die Probe oder das Mikroskop zu bewegen. Es handelt sich hierbei um ein interferometrisches Verfahren, welches auf dem sogenannten *coherence imaging*¹ [26] basiert. Die Kohärenzfunktion wird dabei in einem bestimmten Ab-

¹ Dieses Verfahren ist auch unter den Begriffen *interferometric imaging* [23], *incoherent holography* [24] oder auch *coherence holography* [25] bekannt.

stand zu einer räumlich inkohärenten Quellverteilung gemessen und daraus deren Struktur numerisch rekonstruiert. Ein solches System stellt somit eine praktische Anwendung des Van-Cittert-Zernike-Theorems [27–29] dar. Einen ersten Einsatz fand diese Technik im Rahmen astronomischer Beobachtungen durch die turbulente Erdatmosphäre [30–33]. Spätere Arbeiten widmeten sich weitgehend der Rekonstruktion dreidimensionaler makroskopischer Objektstrukturen [25, 26, 34–41]. Zur Messung der Kohärenzfunktion wurden hierbei zumeist Rotations-Shearing- oder Radial-Shearing-Interferometer verwendet. Ein Versuch, dieses Verfahren in die Mikroskopie zu übertragen, stammt von Potuluri et al. [42]. Dabei wurde jedoch nur das Funktionsprinzip überprüft, ohne die realen Abbildungseigenschaften des Systems zu untersuchen. Zudem wurde die Kohärenzfunktion in einer anscheinend willkürlich gewählten Ebene gemessen. Um ein maximales laterales Auflösungsvermögen zu erreichen, ist es jedoch notwendig, die Kohärenzfunktion in der Austrittspupille des Mikroskopobjektivs zu bestimmen [43].

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Abbildungseigenschaften eines Weitfeldmikroskops auf Basis eines Rotations-Shearing-Interferometers zu untersuchen und mit den theoretischen Vorhersagen zu vergleichen. Der Shearwinkel des verwendeten Interferometers beträgt 180° , weswegen dafür im Folgenden die Bezeichnung *bildinvertierendes Interferometer* (BII) verwendet wird. Das vorgestellte Verfahren wird in Anlehnung an verwandte scannende Techniken [21, 22, 44–47] als *Weitfeldbildinversionsmikroskopie* (*Widefield Image Inversion Microscopy*, WIIM) bezeichnet. Nach einer kurzen Zusammenfassung grundlegender physikalischer Sachverhalte in Kapitel 2 werden in Kapitel 3 Konzepte zur Bestimmung der komplexwertigen Kohärenzfunktion besprochen. Neben verschiedenen Interferometertypen wird dabei auch auf die Unterschiede zwischen quasi-monochromatischer und breitbandiger Beleuchtung eingegangen. Im Anschluss daran wird in Kapitel 4 der Laboraufbau des bildinvertierenden Interferometers vorgestellt und charakterisiert. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf den durch das Interferometer verursachten Aberrationen. Basierend auf der paraxialen Näherung folgt in Kapitel 5 eine mathematische Herleitung der Abbildungseigenschaften der WIIM, welche anschließend experimentell überprüft werden. Dabei wird besonders auf die erweiterte Schärfentiefe und deren Einfluss auf die Rekonstruktion dreidimensional ausgedehnter Objekte eingegangen. Eine weitere Besonderheit dieser Form der Mikroskopie besteht darin, Abbildungsfehler rein numerisch korrigieren zu können. Dies wird sowohl für ein Punktobjekt als auch für 2D-Strukturen nachgewiesen. Die WIIM bietet zudem die Möglichkeit, Objekte spektral aufgelöst zu rekonstruieren. Neben dem experimentellen Nachweis wird der Einfluss der spektralen Bandbreite auf die Struktur der Punktbildverwaschungsfunktion diskutiert.

2 Grundlagen

2.1 Optische Abbildung im Mikroskop

Ein Lichtmikroskop ist ein optisches Instrument, welches verwendet wird, um nahe Objekte vergrößert zu betrachten. Im Gegensatz zu einer einfachen Lupe handelt es sich dabei um ein zusammengesetztes System aus mehreren Linsen. Im einfachsten Fall besteht es aus einer Objektiv- und einer Okularlinse. Während die Objektivlinse ein vergrößertes reelles Bild des Objekts erzeugt, dient das Okular als Lupe, mit der das Zwischenbild betrachtet wird. In modernen Mikroskopen kommen jedoch komplexe, aus mehreren Linsen bestehende Objektive zum Einsatz. Durch die Verwendung verschiedener Blenden ist es möglich, die Abbildungseigenschaften dieser Objektive gezielt zu beeinflussen. Im Folgenden werden daher grundlegende Begriffe eingeführt, auf welche sich im Rahmen dieser Arbeit bezogen wird. Hierfür werden die Nomenklaturen und Definitionen von Born und Wolf [48], Haferkorn [49] sowie von Hecht [50] verwendet.

2.1.1 Blenden und Pupillen

Eine physikalische Begrenzung, welche den Lichtfluss innerhalb eines optischen Systems begrenzt und sich weder in der Objekt- noch in einer Bildebene befindet, wird als *Aperturblende* (AB) bezeichnet. Hierbei kann es sich beispielsweise um den Rand einer Linse oder um eine Lamellenblende handeln. Physische Begrenzungen, welche direkt in der Objekt- oder Bildebene vorhanden sind, werden *Feldblenden* (FB) genannt. Dies kann zum Beispiel ebenfalls eine Lamellenblende oder aber der Rand eines Detektors sein.

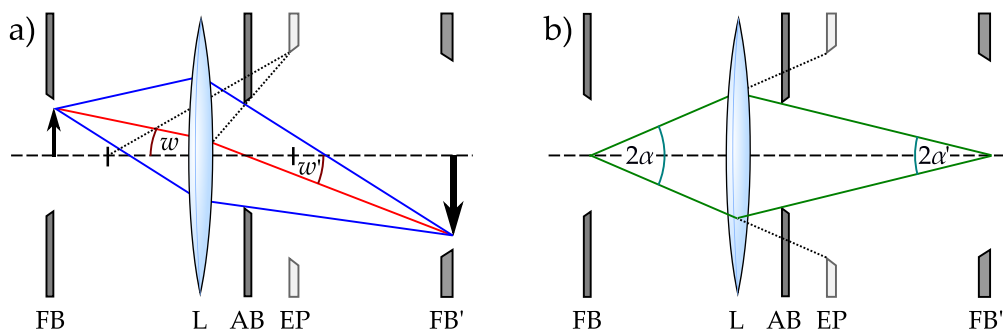


Abbildung 2.1: a) Darstellung einer einstufigen Abbildung unter Verwendung von Feld- und Aperturblenden. Das Bild der Feldblende ist mit FB' gekennzeichnet. b) Illustration des Zusammenhangs zwischen der Eintrittspupille und dem Öffnungswinkel 2α .

Abbildung 2.1.a) zeigt ein einfaches optisches System mit einer Feld- und einer Aperturblende. Das Bild der AB, welches vom Objektraum aus betrachtet werden kann, wird *Eintrittspupille* (EP) genannt. Aus dem Bildraum beobachtet, wird

ihr Bild als *Austrittspupille* (AP) bezeichnet. Befindet sich vor bzw. hinter der AB kein abbildendes Element, stellt sie selbst die Ein- bzw. Austrittspupille dar. Der *Hauptstrahl* entspricht dem Lichtstrahl, welcher die optische Achse (oA) in der AB sowie in den Pupillen schneidet. In der EP geschieht dies unter dem objektseitigen Hauptstrahlwinkel w , wohingegen der Schnittwinkel in der AP als bildseitiger Hauptstrahlwinkel w' bezeichnet wird. Die *Randstrahlen* werden durch die AB definiert und begrenzen das vom Objektpunkt ausgehende Strahlenbündel.

Der *Öffnungs-* oder *Aperturwinkel* ist sowohl ein Maß für die Lichtstärke eines abbildenden Systems als auch für dessen Auflösungsvermögen und Schärfentiefe. Der objektseitige Aperturwinkel 2α ergibt sich, wie in Abbildung 2.1.b) dargestellt, aus dem Durchmesser der Eintrittspupille und deren Abstand zur Objektebene. Für den bildseitigen Aperturwinkel $2\alpha'$ existiert derselbe Zusammenhang bezogen auf die Austrittspupille und deren Entfernung zur Bildebene. Im Kontext der Mikroskopie wird anstelle des Aperturwinkels häufig die *numerische Apertur* (NA) [12] verwendet, welche sich aus der Brechzahl n des Mediums im Objektraum und dem Sinus des halben Öffnungswinkels ergibt:

$$NA = n \sin \alpha. \quad (2.1)$$

2.1.2 Ento- und telezentrische Abbildungen

Da die Hauptstrahlen aller Objektpunkte die optische Achse in der EP schneiden, entspricht dieser Punkt dem Perspektivitätszentrum [49] des optischen Systems. Befindet sich die EP in Lichtrichtung hinter dem Objekt, spricht man von einem *entozentrischen Abbildungssystem*. Der Abbildungsmaßstab verringert sich dann mit wachsender Objektweite [51], was zu einer perspektivischen Verzerrung der 3D Struktur führt. Die reelle Abbildung mit einer einzelnen dünnen Linse stellt ein einfaches Beispiel für ein solches System dar. Der Hauptstrahl ist in diesem Fall identisch mit dem Mittelpunktstrahl, wodurch zudem $w = w'$ gilt.

Eine perspektivische Verzerrung kann durch ein *telezentrisches Abbildungssystem* verhindert werden. Befindet sich die Aperturblende in der hinteren Brennebene des optischen Systems, liegt die Eintrittspupille im Unendlichen. Der Hauptstrahl im Objektraum ist daher unabhängig von der Objektweite und parallel zur optischen Achse, weswegen man unter diesen Umständen von einem objektseitig telezentrischen System spricht. Abbildung 2.2 veranschaulicht das Funktionsprinzip am Beispiel eines Objektpunkts für zwei verschiedene Gegenstandsweiten g und g' . Eine Änderung der Entfernung führt dazu, dass auf dem Schirm (S) im Abstand b ein Zerstreungskreis entsteht, welcher um die ursprüngliche Position des Bildpunkts zentriert ist. Der Abbildungsmaßstab in der Ebene des Schirms ist daher unabhängig von der Objektweite. Gleiches gilt für den objektseitigen Aper-

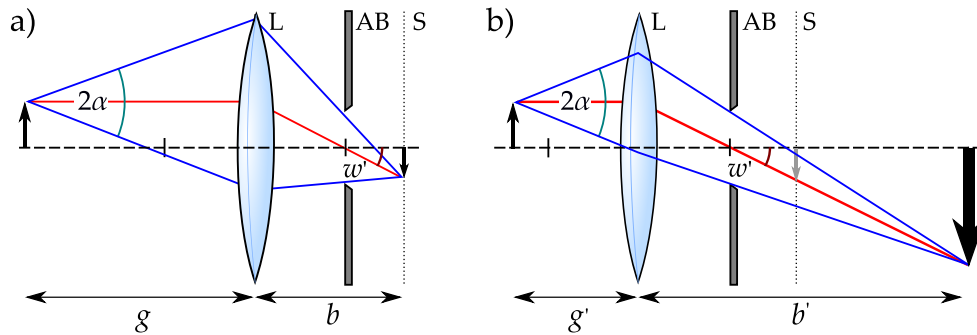


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der telezentrischen Abbildung für die beiden Gegenstandsweiten g und g' ($g > g'$).

turwinkel 2α , welcher ebenfalls unabhängig von der Objektweite konstant bleibt.

In einem bildseitig telezentrischen System befindet sich die AB in der vorderen Brennebene des optischen Systems. In diesem Fall liegt die Austrittspupille im Unendlichen, wodurch sämtliche Hauptstrahlen im Bildraum parallel zur optischen Achse verlaufen.

2.1.3 Weitfeldmikroskop mit Köhlerscher Beleuchtung

In Abbildung 2.3 ist der schematische Aufbau eines konventionellen Durchlichtmikroskops dargestellt. Bei dem heutzutage weitverbreiteten Typ mit Unendlich-Strahlengang entspricht die vordere Brennebene des Mikroskopobjektivs (MO) gleichzeitig der Objektebene (OE). Das Präparat wird daher zunächst ins Unendliche abgebildet. In Kombination mit der Tubuslinse L_T entsteht jedoch ein reelles Zwischenbild (ZB), welches entweder mit einem Okular beobachtet oder direkt mit einer Kamera aufgenommen werden kann. Im Gegensatz zu scannenden Mikroskopieverfahren, bei welchen das Objekt punktwise aufgenommen wird, können mit einem solchen Lichtmikroskop gleichzeitig große Teile der Probe betrachtet werden, weswegen man auch von einem *Weitfeldmikroskop* spricht.

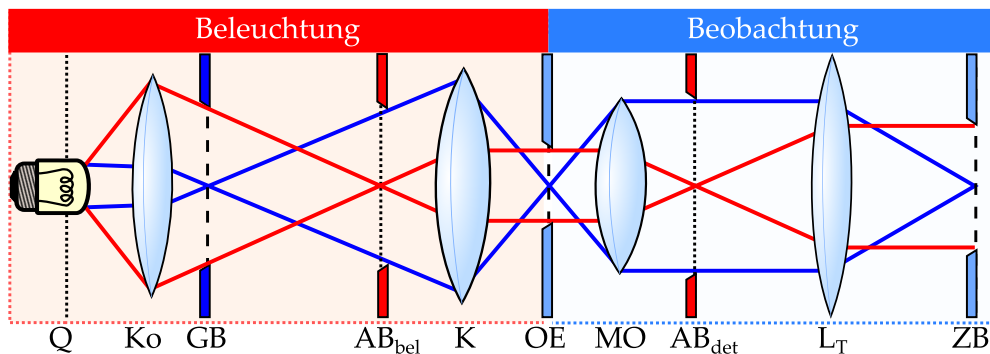


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines Weitfeldmikroskops mit Unendlich-Strahlengang. Strukturen, welche sich in der Objektebene oder einer dazu konjugierten Ebene befinden, sind blau dargestellt, während die beleuchtungs- und beobachtungsseitigen Aperturblenden rot eingezeichnet sind.

Durch die Köhlersche Beleuchtung [49, 52] ist eine homogene und räumlich inkohärente Ausleuchtung des Präparats möglich. Hierbei wird die Lichtquelle (Q) mithilfe des Kondensors (Ko) in die vordere Brennebene des Kollimators (K) abgebildet. Jeder Punkt der Lichtquelle erzeugt im Objektraum somit ein parallelisiertes Strahlenbündel. Durch die Überlagerung aller zueinander inkohärenten Strahlenbündel ergibt sich eine gleichmäßige Beleuchtung, deren Kohärenzeigenschaften von der beleuchtungsseitigen Aperturblende AB_{bel} bestimmt wird. Der Durchmesser des ausgeleuchteten Bereichs wird durch die Gesichtsfeldblende (GB) bestimmt, welche mithilfe des Kollimators in die Objektebene abgebildet wird.

Mit wachsendem Aperturbblendendurchmesser nimmt die Größe des Bereichs ab, in welchem die Beleuchtung als näherungsweise räumlich kohärent behandelt werden kann. Wird die Aperturblende so groß, dass der beleuchtungsseitige Öffnungswinkel mindestens dem beobachtungsseitigen entspricht, gilt für die Beleuchtung der Objektebene die räumlich inkohärente Näherung [29].

2.1.4 Punktbildverwaschungsfunktion

Bevor näher auf die Kohärenzeigenschaften eines Wellenfeldes eingegangen wird, sollen zunächst die Konsequenzen der Wellennatur des Lichts auf die Abbildung im Mikroskop erläutert werden. Die geometrische Optik kann als Grenzfall der Wellenoptik für verschwindend kleine Wellenlängen λ interpretiert werden [48]. Bei der Abbildung von Objekten, deren Details in der Größenordnung der Wellenlänge liegen, bricht diese Näherung jedoch zusammen. Aufgrund der begrenzten Größe der Aperturblende kommt es durch die Welleneigenschaften des Lichts zu Beugungseffekten. Diese führen dazu, dass ein Objektpunkt nicht mehr in einem Punkt im Bildraum fokussiert wird. Stattdessen wird das Licht in ein ausgedehntes Volumen abgebildet [48, 53–55]. Mathematisch lässt sich dessen Struktur durch die sogenannte *Punktbildverwaschungsfunktion* (*Point Spread Function*, PSF) beschreiben, bei welcher jedoch zwischen räumlich kohärentem und inkohärentem Licht unterschieden werden muss. Unter der Annahme räumlicher Inkohärenz² und einer ortsunabhängigen PSF ergibt sich die Intensitätsverteilung im Bildraum durch die Faltung (\otimes) der PSF mit der Intensitätsverteilung der Objektstruktur:

$$I_{\text{Bild}}(\mathbf{r}, z) = \text{PSF}(\mathbf{r}, z) \otimes I_{\text{Objekt}}(\mathbf{r}, z). \quad (2.2)$$

Hierbei entspricht $\mathbf{r} = (x, y)$ dem lateralen Ortsvektor eines Bildpunkts und z dessen axialer Position im Raum. Der axiale Abstand zur geometrisch-optischen Fokusebene wird nachfolgend mit Δz bezeichnet. Im Rahmen der paraxialen Näherung [48] (kleine Aperturwinkel) lässt sich die auf ein Maximum von 1 normierte

² Da räumlich inkohärentes Licht eine Grundvoraussetzung für das in dieser Arbeit vorgestellte Mikroskopieverfahren ist, wird an dieser Stelle nicht auf die räumlich kohärente Abbildung eingegangen. Für weiterführende Informationen wird beispielsweise auf [56] verwiesen.

PSF mithilfe von Gleichung 2.3 [48, 54] berechnen:

$$\text{PSF}(u,v) = \frac{1}{\pi^2} \left| \int_0^1 \int_0^{2\pi} \mathcal{P}(\rho, \theta) \exp \left(-iv\rho \cos(\theta - \psi) - \frac{1}{2}iu\rho^2 \right) \rho \, d\rho \, d\theta \right|^2. \quad (2.3)$$

Wie in der Literatur oft üblich, werden hier die dimensionslosen optischen Koordinaten $v = \frac{2\pi}{\lambda} \text{NA} \sqrt{x^2 + y^2}$ und $u = \frac{2\pi}{\lambda} \text{NA}^2 \Delta z$ sowie der Azimutwinkel $\psi = \arctan(x/y)$ verwendet. Die Integration über die Pupille \mathcal{P} erfolgt mithilfe der Polarkoordinaten $0 \leq \rho \leq 1$ und $0 \leq \theta \leq 2\pi$. Für die folgenden Betrachtungen wird zunächst von quasi-monochromatischem Licht ausgegangen; es wird daher angenommen, dass die spektrale Bandbreite $\Delta\lambda$ sehr viel kleiner als die Wellenlänge des Lichts ist. Abbildung 2.4.a) zeigt den axialen Schnitt durch die nach Gleichung 2.3 berechnete PSF eines aberrationsfreien Systems mit runder Pupille.

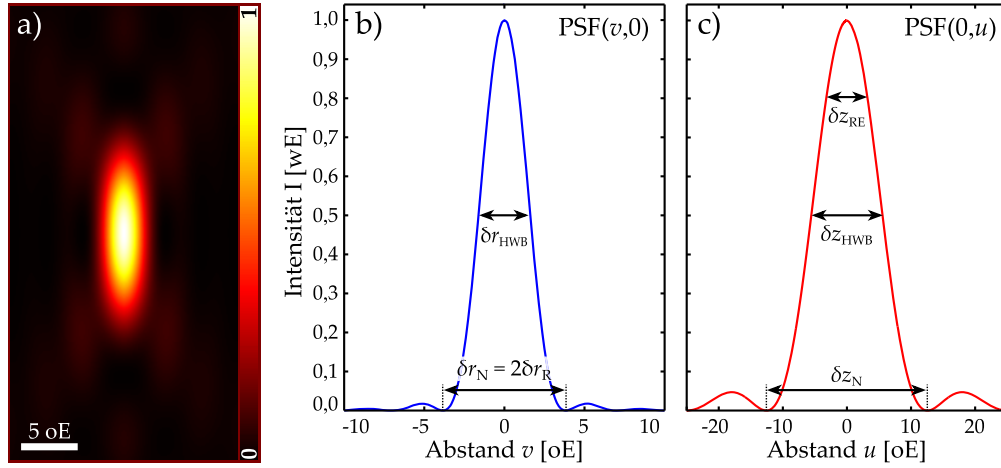


Abbildung 2.4: a) Falschfarbendarstellung des axialen Schnitts durch die PSF. Der weiße Balken ist hierbei 5 oE (optische Einheiten) lang. b) und c) stellen die normierte Intensität (willkürliche Einheiten, wE) der PSF in lateraler bzw. axialer Richtung dar.

Die Lösungen für $u = 0$ bzw. $v = 0$ sind durch die Gleichungen 2.4 und 2.5 gegeben und entsprechen den Intensitätsverläufen in lateraler bzw. axialer Richtung (Abbildungen 2.4.b) und 2.4.c)).

$$\text{PSF}(0,v) = \left| 2 \frac{J_1(v)}{v} \right|^2 \quad (2.4)$$

$$\text{PSF}(u,0) = \left| \frac{\sin(u/4)}{u/4} \right|^2 \quad (2.5)$$

Die nach Gleichung 2.4 gegebene laterale Punktbildverwaschungsfunktion in der Fokusebene wird in der Literatur auch oft als Airy-Scheibchen bezeichnet. J_1 symbolisiert hierbei die Bessel-Funktion erster Gattung und erster Ordnung.

2.1.5 Auflösungsvermögen und Schärfentiefe

Aufgrund der dreidimensionalen Ausdehnung der Punktbildverwaschungsfunktion müssen zwei Objektpunkte einen gewissen Mindestabstand aufweisen, damit sie im Bild aufgelöst dargestellt werden können. Nach dem *Rayleigh-Kriterium* ist dieser Abstand in lateraler Richtung erreicht, wenn das Maximum des einen Punktbildes in das erste Beugungsminimum des anderen abgebildet wird [48]. Der in die Objektebene projizierte Abstand der Objektpunkte δr_R (Gleichung 2.6) entspricht folglich der Hälfte des Durchmessers³ δr_N des zentralen Beugungsscheibchens.

$$\delta r_R = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.6)$$

$$\delta r_{\text{HWB}} = 0,51 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.7)$$

Auch die *Halbwertsbreite* (HWB) der PSF kann als Maß für das Auflösungsvermögen des abbildenden Systems dienen. Nach Gleichung 2.7 entspricht sie ca. dem Abbeschen Auflösungskriterium von $\delta r_{\text{Abbe}} = 0,5\lambda/NA$ [12].

Bezogen auf die axiale Ausdehnung der Probe ist im Rahmen der konventionellen Weitfeldmikroskopie vor allem die Schärfentiefe von Interesse. Diese entspricht der axialen Ausdehnung des Bereichs, in welchem sich ein Objektpunkt befinden kann, um dennoch hinreichend scharf abgebildet zu werden. Wie auch beim lateralen Auflösungsvermögen finden sich in der Literatur diverse und zum Teil stark voneinander abweichende Kriterien für die Schärfentiefe. So wird von Wilson [57] beispielsweise der Abstand δz_N der ersten axialen Nullstellen verwendet:

$$\delta z_N = 4 \frac{\lambda}{NA^2} \quad (2.8)$$

$$\delta z_{\text{HWB}} = 1,77 \frac{\lambda}{NA^2} \quad (2.9)$$

$$\delta z_{\text{RE}} = \frac{\lambda}{NA^2} \quad (2.10)$$

Sheppard [58] hingegen bezieht sich auf die Halbwertsbreite δz_{HWB} der Punktbildverwaschungsfunktion entlang der optischen Achse (Gleichung 2.9). Der Bereich δz_{RE} , in welchem die PSF in axialer Richtung mindestens 80 % ihres Maximalwertes aufweist, wird wiederum von Born und Wolf [48] als Kriterium für die Schärfentiefe herangezogen. Dieser Abstand ist durch Gleichung 2.10 gegeben und wird in der Literatur auch als Rayleighlänge oder *Rayleighheit* (RE) bezeichnet.

Um die Unterschiede der verschiedenen Kriterien zu verdeutlichen, wurden die in Abbildung 2.5 dargestellten Bilder eines Ausschnitts aus dem Logo der Friedrich-Schiller-Universität Jena berechnet. Sie entsprechen vier verschiedenen Abständen Δz zur Fokusebene. Für die Berechnung wurde von einem beugungsbegrenzten Weitfeldmikroskop mit Köhlerscher Beleuchtung ausgegangen. Während Abbildung 2.5.a) die Struktur genau in der Fokusebene darstellt, zeigen die Abbildungen 2.5.b)–2.5.d) das Logo in der Hälfte der durch die Gleichungen 2.8–2.10

³ Der Durchmesser des Beugungsscheibchens wird durch den Abstand der ersten Nullstellen bzw. der ersten Minima definiert.

gegebenen Abstände. Wie aus den Bildern deutlich wird, ist die Verwaschung der Details aufgrund der Defokussierung bei $\delta z_{\text{HWB}}/2$ und $\delta z_{\text{N}}/2$ bereits deutlich zu erkennen. In einer Entfernung von $\delta z_{\text{RE}}/2$ können hingegen noch ähnlich feine Strukturen wie in der Fokusebene nachgewiesen werden. Aus diesem Grund erscheint die Definition der Schärfentiefe nach Gleichung 2.10 am zweckmäßigsten.

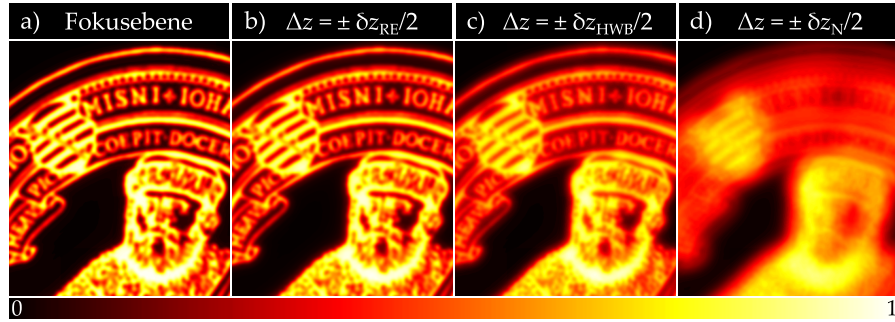


Abbildung 2.5: Abbildung einer zweidimensionalen Struktur direkt in der Fokusebene (a), verglichen mit der um $\delta z_{\text{RE}}/2$, $\delta z_{\text{HWB}}/2$ und $\delta z_{\text{N}}/2$ defokussierten Abbildung (b–d).

2.2 Charakterisierung der Aberrationen optischer Systeme

Im Rahmen der Wellenoptik können die Abbildungsfehler eines optischen Systems als eine Abweichung der Wellenfront von der Gaußschen Referenzsphäre innerhalb der Austrittspupille dargestellt werden [59]. In Gleichung 2.3 (Seite 7) lässt sich diese Abweichung mithilfe der komplexwertigen Pupillenfunktion $\mathcal{P}(\rho, \theta)$ und der Aberrationsfunktion⁴ $\Phi(\rho, \theta)$ berücksichtigen [48]:

$$\mathcal{P}(\rho, \theta) = |\mathcal{P}(\rho, \theta)| \exp \left(i \frac{2\pi}{\lambda} \Phi(\rho, \theta) \right). \quad (2.11)$$

Aufgrund der Abbildungsfehler konvergiert das Wellenfeld nicht zu einem idealen, beugungsbegrenzten Punktbild. Stattdessen kommt es zu einer Verwaschung des Beugungsscheibchens, was unter räumlich inkohärenten Bedingungen zu einer Verringerung des Bildkontrastes und des Auflösungsvermögens führt [55, 60].

2.2.1 Strehl-Verhältnis

Das Strehl-Verhältnis SV stellt eine einfache Maßzahl für die Abbildungsqualität eines optischen Systems dar. Es ist definiert als das Verhältnis der Maximalintensität des gemessenen, aberrierten Punktbildes PSF_{Exp} zu der des beugungsbegrenzten Punktbildes in der Fokusebene PSF [48, 60]:

$$\text{SV} = \frac{\text{PSF}_{\text{Exp}}(0,0,0)}{\text{PSF}(0,0,0)} \quad (2.12)$$

⁴ Im polychromatischen Fall kann Φ eine Funktion der Wellenlänge sein. Die polychromatische PSF ergibt sich dann durch die spektral gewichtete Integration von Gleichung 2.3 über λ [59].

$$SV = \frac{\left| \int_0^1 \int_0^{2\pi} |\mathcal{P}(\rho, \theta)| \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} \Phi(\rho, \theta)\right) \rho \, d\rho \, d\theta \right|^2}{\left| \int_0^\infty \int_0^{2\pi} |\mathcal{P}(\rho, \theta)| \rho \, d\rho \, d\theta \right|^2}. \quad (2.13)$$

Da sämtliche Strukturinformationen der PSF_{Exp} auf eine einzige Maßzahl reduziert werden, ist deren Aussagekraft über die Bildqualität beschränkt und die Anwendung nur bis zu einem Wert $SV \approx 0,6$ sinnvoll [60]. Mithilfe der Näherung [48]

$$SV \approx 1 - \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \overline{\delta\Phi^2} \quad (2.14)$$

lässt sich das Strehl-Verhältnis durch die mittlere quadratische Abweichung $\overline{\delta\Phi^2}$ der aberrierten Wellenfront von der Referenzsphäre darstellen. Die Quadratwurzel von $\overline{\delta\Phi^2}$ wird auch als RMSE (*Root-Mean-Square-Error*) bezeichnet. Für $SV \gtrsim 0,8$ wird von einer beugungsbegrenzten Abbildung ausgegangen, woraus $RMSE \lesssim \lambda/14$ folgt [59, 61] (Maréchal-Kriterium).

2.2.2 Zernike-Polynome

In optischen Systemen können diverse Abbildungsfehler mit jeweils unterschiedlichen Ursachen existieren. Daher ist es zweckmäßig, die Aberrationsfunktion Φ als gewichtete Summe einzelner Wellenfrontfehler darzustellen. In der Mikroskopie, aber auch vielen anderen Teilgebieten der Optik, wird mit runden Austrittspupillen gearbeitet. Aus diesem Grund bietet es sich an, die Aberrationen durch Zernike-Polynome [48, 62–64] darzustellen. Es handelt sich dabei um ein normiertes, vollständiges und orthogonales System von Polynomen, mit welchen sich sämtliche Wellenfrontfehler in der Austrittspupille darstellen lassen. Die Polynome Z_n^m sind auf dem Einheitskreis definiert und werden aufgrund ihrer Struktur oft in den Polarkoordinaten ρ und θ angegeben:

$$Z_n^m(\rho, \theta) = \begin{cases} N_n^m R_n^{|m|}(\rho) \cos(m\theta) & m \geq 0 \\ -N_n^m R_n^{|m|}(\rho) \sin(m\theta) & m < 0 \end{cases} \quad (2.15)$$

$$R_n^{|m|}(\rho) = \sum_{j=0}^{(n-|m|)/2} \frac{(-1)^j (n-j)!}{j! \left(\frac{n+|m|}{2} - j\right)! \left(\frac{n-|m|}{2} - j\right)!} \rho^{n-2j} \quad (2.16)$$

$$N_n^m = \sqrt{\frac{2(n+1)}{1 + \delta_{m0}}}. \quad (2.17)$$

Hierbei gilt die Bedingung, dass $n - |m|$ sowohl größer 0 als auch gerade sein muss. Der Index n gibt nach Gleichung 2.16 die höchste Potenz im radialen Polynom $R_n^{|m|}(\rho)$ an und entspricht daher der radialen Ordnung der Zernike-Polynome. Im

Gegensatz dazu gibt der Index m die Frequenz der Sinus- bzw. Kosinus-Funktion in Gleichung 2.15 an, weswegen er als azimutale Ordnung oder azimutale Frequenz bezeichnet wird. N_n^m (Gleichung 2.17) stellt einen Normierungsfaktor dar, wobei δ_{m0} dem Kronecker-Delta entspricht; es ist daher 1 für $m = 0$ und sonst 0. Eine Übersicht über die Zernike-Polynome bis zur vierten radialen Ordnung sowie der Name der ihnen zugeordneten Abbildungsfehler ist in Tabelle 2.1 aufgelistet. Abbildung 2.6, zeigt jeweils ein Polynom aus der ersten bis vierten Ordnung.

Tabelle 2.1: Übersicht der Zernike-Polynome bis zur vierten Ordnung

n	m	$Z_n^m(\rho, \theta)$	Name
0	0	1	Konstanter Phasenversatz
1	-1	$2\rho \sin(\theta)$	y -Verkippung
1	+1	$2\rho \cos(\theta)$	x -Verkippung
2	-2	$\sqrt{6}\rho^2 \sin(2\theta)$	Astigmatismus (45°)
2	0	$\sqrt{3}(2\rho^2 - 1)$	Defokus
2	+2	$\sqrt{6}\rho^2 \cos(2\theta)$	Astigmatismus (0°)
3	-3	$\sqrt{8}\rho^3 \sin(3\theta)$	Dreiblattfehler (30°)
3	-1	$\sqrt{8}(3\rho^3 - 2\rho) \sin(\theta)$	Koma (90°)
3	+1	$\sqrt{8}(3\rho^3 - 2\rho) \cos(\theta)$	Koma (0°)
3	+3	$\sqrt{8}\rho^3 \cos(3\theta)$	Dreiblattfehler (0°)
4	-4	$\sqrt{10}\rho^4 \sin(4\theta)$	Vierblattfehler (22,5°)
4	-2	$\sqrt{10}(4\rho^4 - 3\rho^2) \sin(2\theta)$	Sekundärer Astigmatismus (45°)
4	0	$\sqrt{5}(6\rho^4 - 6\rho^2 + 1)$	Sphärische Aberration
4	+2	$\sqrt{10}(4\rho^4 - 3\rho^2) \cos(2\theta)$	Sekundärer Astigmatismus (0°)
4	+4	$\sqrt{10}\rho^4 \cos(4\theta)$	Vierblattfehler (0°)
⋮	⋮	⋮	⋮

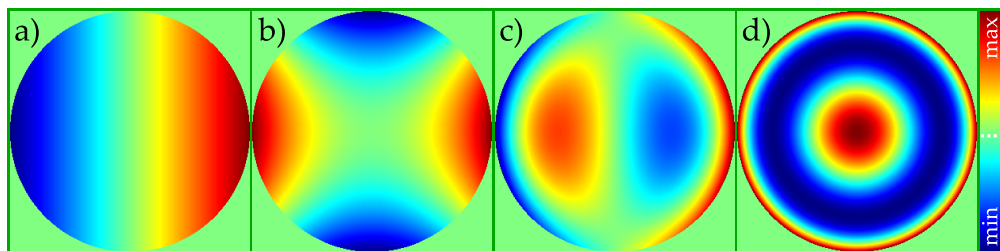


Abbildung 2.6: Falschfarbendarstellung der Zernike-Polynome Z_1^1 (a), Z_2^2 (b), Z_3^1 (c) und Z_4^0 (d). Sie entsprechen der Verkippung in x -Richtung, dem Astigmatismus, der Koma und der sphärischen Aberration.

Mittels der Zernike-Koeffizienten c_n^m ist es möglich, einen beliebigen Wellenfrontfehler innerhalb einer runden Pupille als unendliche Summe der Zernike-Polynome

auszudrücken:

$$\Phi(\rho, \theta) = \sum_{n=0}^{\infty} \sum_{m=-n}^n c_n^m Z_n^m(\rho, \theta). \quad (2.18)$$

Der Wert von c_n^m entspricht in der gewählten Darstellung dem RMSE-Wert, mit welchem die jeweiligen Aberrationen zur Deformation der Wellenfront beitragen. Folglich ist der RMSE-Wert des Gesamtwellenfrontfehlers gegeben durch:

$$\text{RMSE} = \sqrt{\sum_{n=0}^{\infty} \sum_{m=-n}^n (c_n^m)^2}. \quad (2.19)$$

2.3 Kohärenz

Im Rahmen der Wellenoptik beschreibt der Begriff der *Kohärenz* die Fähigkeit des Lichts zur *Interferenz*. Darunter versteht man wiederum die zeitlich konstante Superposition von zwei oder mehr Wellenfeldern [48, 50].

2.3.1 Kohärenzfunktion

Die beobachtbare Intensität elektromagnetischer Strahlung entspricht dem zeitlichen Mittelwert ($\langle \cdot \rangle_T$) des Betrags des Poynting-Vektors. Sie ergibt sich daher aus dem Betragsquadrat der über die Integrationszeit T des Detektors gemittelten elektrischen Feldstärke E [50]:

$$I = \varepsilon c \langle |E|^2 \rangle_T. \quad (2.20)$$

Hierbei ist ε die Dielektrizitätskonstante des Mediums und c die Lichtgeschwindigkeit im Medium. Im Vakuum wie auch in linearen und isotropen Medien entspricht die Dielektrizitätskonstante ε einem skalaren und konstanten Term. Unter diesen Bedingungen ändern sowohl c als auch ε die mathematische Struktur der folgenden Gleichungen nicht. Diese Konstanten werden daher, wie in der Literatur oft üblich, bei der Formulierung mathematischer Zusammenhänge nicht aufgeführt.

Nach dem Superpositionsprinzip [50] ergibt sich die elektrische Feldstärke zweier elektromagnetischer Wellen aus der Summe der einzelnen Feldstärken. Wie am Beispiel des in Abbildung 2.7 skizzierten Doppelspaltexperiments deutlich wird, können die von den Punkten $P_1(\mathbf{r}_1)$ und $P_2(\mathbf{r}_2)$ ausgehenden Wellenfelder in dem Punkt $P(\mathbf{r})$ unterschiedliche Laufzeiten $t_1 = d_1/c$ und $t_2 = d_2/c$ aufweisen.

Die Intensitätsverteilung im Punkt $P(\mathbf{r})$ ergibt sich damit nach [65] zu:

$$I(\mathbf{r}) = \langle |K_1 E(\mathbf{r}_1, t - t_1) + K_2 E(\mathbf{r}_2, t - t_2)|^2 \rangle_T. \quad (2.21)$$

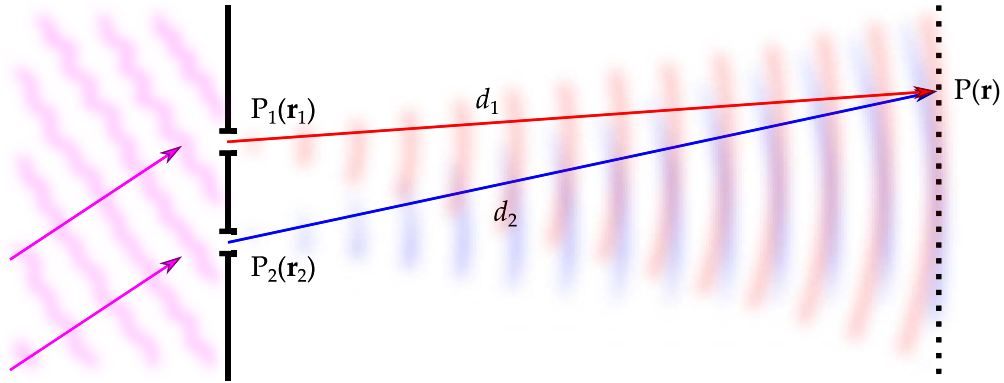


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Youngschen Doppelspaltexperiments nach [65].

Die Faktoren $K_{1,2}$ werden als Propagatoren bezeichnet und sind umgekehrt proportional zu den Abständen $d_{1,2}$. Zudem sind sie von der Größe der Spaltöffnungen abhängig [50, 65]. Setzt man voraus, dass die Wellenfelder stationär und ergodisch sind [29, 65], kann Gleichung 2.21 nach [65] wie folgt dargestellt werden:

$$I(\mathbf{r}) = I_1(\mathbf{r}) + I_2(\mathbf{r}) + 2\Re\{K_1^* K_2 \Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau)\}. \quad (2.22)$$

Unter diesen Bedingungen ist $I(\mathbf{r})$ nicht mehr von den absoluten Zeiten abhängig, sondern nur von der Laufzeitdifferenz $\tau = t_1 - t_2$. Die Intensitätsverteilung lässt sich somit als Summe darstellen, bestehend aus den Teilintensitäten $I_{1,2}(\mathbf{r}) = |K_{1,2}|^2 \langle E^2(\mathbf{r}_{1,2}, t - t_{1,2}) \rangle_T$ und dem Realteil (\Re) der durch $K_1^* K_2$ gewichteten *komplexen Kohärenzfunktion*⁵ [48, 65, 66]:

$$\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau) = \langle E^*(\mathbf{r}_1, t) E(\mathbf{r}_2, t + \tau) \rangle_T. \quad (2.23)$$

Sie entspricht demnach der Kreuzkorrelation zwischen zwei elektromagnetischen Wellen an den Orten \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 mit einem zeitlichen Versatz von τ . Sind die Wellenfelder vollkommen unkorreliert ($\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau) = 0$), ist die Gesamtintensität $I(\mathbf{r})$ durch die Summe der Teilintensitäten $I_{1,2}(\mathbf{r})$ gegeben. Besteht jedoch eine partielle oder vollständige Korrelation, wird zudem folgender Interferenzterm beobachtet [48, 65]:

$$2\Re\{K_1^* K_2 \Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau)\} = 2\sqrt{I_1(\mathbf{r}) I_2(\mathbf{r})} |\gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau)| \cos(\vartheta(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau)). \quad (2.24)$$

Die durch $\sqrt{I_1(\mathbf{r}) I_2(\mathbf{r})}$ normierte Kohärenzfunktion wird als *komplexer Kohärenzgrad* γ bezeichnet, wobei ϑ dessen Phasenfunktion entspricht. Der Kohärenzgrad

⁵ Für die Berechnung des zeitlichen Mittelwerts wird hierbei angenommen, dass die Integrationszeit T des Detektors sehr viel größer ist als die Zeitskala, auf welcher $E_{1,2}$ fluktuiert. Man verwendet daher den Grenzwert: $\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^{+T} E_1^*(\mathbf{r}_1, t) E_2(\mathbf{r}_2, t + \tau) dt$.

ist ein Maß für die *Sichtbarkeit* V der Interferenzstruktur [48]:

$$V(\mathbf{r}) = \frac{I_+(\mathbf{r}) - I_-(\mathbf{r})}{I_+(\mathbf{r}) + I_-(\mathbf{r})} \quad (2.25)$$

$$= 2 \frac{\sqrt{I_1(\mathbf{r})I_2(\mathbf{r})}}{I_1(\mathbf{r}) + I_2(\mathbf{r})} |\gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau)| \quad (2.26)$$

$$I_{\pm}(\mathbf{r}) = I_1(\mathbf{r}) + I_2(\mathbf{r}) \pm 2\sqrt{I_1(\mathbf{r})I_2(\mathbf{r})} |\gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau)|. \quad (2.27)$$

Während $|\gamma| = 0$ den inkohärenten und $|\gamma| = 1$ den kohärenten Fall beschreibt, entspricht $0 < |\gamma| < 1$ der partiellen Kohärenz. Allerdings sind weder die Kohärenzfunktion noch der Kohärenzgrad direkt messbare physikalische Größen. Wie aus den Gleichungen 2.22 – 2.26 folgt, können sie jedoch durch die Messung und Auswertung von Interferenzstrukturen bestimmt werden.

2.3.2 Zeitliche und räumliche Kohärenz

Durch die Abhängigkeit der Kohärenzfunktion von den Orten $\mathbf{r}_{1,2}$ und der Laufzeitdifferenz τ lassen sich zwei Spezialfälle des Kohärenzbegriffs definieren. Die Korrelation von zwei Wellenfeldern am gleichen Ort ($\mathbf{r}_1 = \mathbf{r}_2 = \mathbf{r}$), aber zu zwei Zeitpunkten mit der Zeitdifferenz τ , wird als *zeitliche Kohärenz* bezeichnet [29, 65]. Über Gleichung 2.28 ist sie mit dem Spektrum $S(\mathbf{r}, \omega)$ des elektromagnetischen Wellenfeldes verknüpft (Wiener-Khintschin-Theorem) [48, 67, 68]. Hierbei ist $\omega = 2\pi \frac{c}{\lambda}$ die Kreisfrequenz des Lichts mit der Wellenlänge λ .

$$\Gamma(\mathbf{r}, \mathbf{r}, \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\mathbf{r}, \omega) \exp(-i\omega\tau) d\omega \quad (2.28)$$

Die *Kohärenzlänge* l_c repräsentiert den Weg, welchen das Licht während der *Kohärenzzeit* τ_c zurücklegt. Für eine Lichtquelle, welche eine gaußförmige Spektralverteilung mit der Halbwertsbreite $\Delta\omega$ bzw. $\Delta\lambda$ besitzt, ergibt sich die Kohärenzlänge nach [29] beispielsweise zu:

$$l_c = 8 \ln(2) \frac{c}{\Delta\omega} \quad \text{bzw.} \quad l_c = \frac{4 \ln(2)}{\pi} \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}. \quad (2.29)$$

Die Einfüllende der Interferenzstruktur ist unter diesen Bedingungen ebenfalls gaußförmig. Ein klassischer Versuchsaufbau, mit welchem die Kohärenzzeit über die Messung der Kohärenzlänge bestimmt werden kann, ist zum Beispiel das Michelson-Interferometer [48, 69].

Betrachtet man die Korrelation des Wellenfeldes zwischen zwei Punkten \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 im Raum, aber ohne zeitlichen Versatz ($\tau = 0$ s), spricht man von der *räumlichen Kohärenzfunktion* [29, 65]:

$$\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, 0). \quad (2.30)$$

Dabei handelt es sich ebenfalls um eine komplexwertige Funktion, deren Phase im Folgenden mit ϕ bezeichnet wird.

Wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird, ist die räumliche Kohärenzfunktion mit der Größe und Struktur der Quellverteilung verknüpft [29]. Der bereits in Abbildung 2.7 gezeigte Youngsche Doppelspalt ist ein klassischer Versuchsaufbau zur Bestimmung der räumlichen Kohärenz.

2.3.3 Propagation der räumlichen Kohärenzfunktion

Aufgrund ihrer Definition als Kreuzkorrelation zweier Wellenfelder kann die Propagation der Kohärenzfunktion auf ähnliche Art und Weise beschrieben werden wie die der Wellenfelder⁶. Dies gilt insbesondere auch für die beiden im Folgenden beschriebenen Vorgänge: die Freiraumausbreitung und die Transmission durch dünne Beugungsstrukturen.

Im quasi-monochromatischen Fall lässt sich die Ausbreitung der räumlichen Kohärenzfunktion durch den Freiraum im Rahmen der Fresnel-Näherung [48] mathematisch folgendermaßen formulieren [65]:

$$\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \frac{\exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_2^2 - \mathbf{r}_1^2]\right)}{(\lambda z)^2} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \Gamma(\boldsymbol{\rho}_1, \boldsymbol{\rho}_2) \exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda z} [\boldsymbol{\rho}_2^2 - \boldsymbol{\rho}_1^2]\right) \times \exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_2 \boldsymbol{\rho}_2 - \mathbf{r}_1 \boldsymbol{\rho}_1]\right) d\boldsymbol{\rho}_1 d\boldsymbol{\rho}_2. \quad (2.31)$$

In dieser Darstellung wird davon ausgegangen, dass sich die räumliche Kohärenzfunktion von einer Ebene ($\mathbf{r} = (x, y)$) in eine andere, zu ihr parallele Ebene ($\boldsymbol{\rho} = (\xi, \eta)$) ausbreitet. Der Abstand dieser beiden Ebenen zueinander sei z . Diese Notation wird auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendet. Für räumlich inkohärente Quellen ergibt sich die räumliche Kohärenzfunktion nach [29] zu:

$$\Gamma(\boldsymbol{\rho}_1, \boldsymbol{\rho}_2) = \kappa I(\boldsymbol{\rho}_1) \delta(\boldsymbol{\rho}_1 - \boldsymbol{\rho}_2). \quad (2.32)$$

Hierbei gilt $\kappa = \lambda^2/\pi$ und $\delta(\cdot)$ steht für die Delta-Distribution. Ist die Ausdehnung der Quelle sehr viel kleiner als deren Abstand z zur Beobachtungsebene, reduziert sich Gleichung 2.31 nach [65] zu:

$$\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \kappa \frac{\exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_2^2 - \mathbf{r}_1^2]\right)}{(\lambda z)^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} I(\boldsymbol{\rho}) \exp\left(-i\frac{2\pi}{\lambda z} (\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1) \boldsymbol{\rho}\right) d\boldsymbol{\rho}. \quad (2.33)$$

⁶ Wie beispielsweise durch Mandel und Wolf [65] gezeigt wird, lässt sich die Ausbreitung der Kohärenzfunktion im Freiraum auf die beiden Wellengleichungen $\square_1 \Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau) = 0$ und $\square_2 \Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau) = 0$ zurückführen. Hierbei entspricht $\square_{1,2}$ dem d'Alembert-Operator mit der räumlichen Ableitung nach der jeweiligen Ortskoordinate $\mathbf{r}_{1,2}$.

Diese Formulierung der Kohärenzfunktion repräsentiert die Fraunhofer-Näherung [48] des *Van-Cittert-Zernike-Theorems* (VCZT) [27–29]. Aus Gleichung 2.33 wird ersichtlich, dass die Kohärenzfunktion im Fernfeld einer räumlich inkohärenten Quellverteilung der Fouriertransformation ihrer Intensitätsverteilung entspricht, welche mit einem quadratischen Phasenterm moduliert ist. Γ enthält somit die Strukturinformationen der Quelle in Form eines modifizierten Ortsfrequenzspektrums. Durch geeignete Rekonstruktionsalgorithmen ist es daher möglich, die Intensitätsverteilung der Quelle aus der räumlichen Kohärenzfunktion zu berechnen. Durch die Generalisierungen des VCZTs, auf welche an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden kann, ist es möglich, auch die Struktur dreidimensionaler Intensitätsverteilungen unter Fernfeld- [70, 71] und Nahfeldbedingungen [34] zu rekonstruieren. Derartige Verfahren werden im Folgenden unter dem Begriff *coherence imaging* zusammengefasst.

Mithilfe einer Linse (Brennweite f) ist es möglich, den Fraunhoferfall (Fernfeld-Näherung) zu realisieren ($2f$ -Aufbau [55]). Dadurch entfällt der quadratische Vorfaktor und die Kohärenzfunktion wird ortsinvariant. Γ ist folglich nur noch eine Funktion des Differenzvektors $\Delta \mathbf{r} = \mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1$, wobei \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 in der Brennebene der Linse liegen (Anhang A):

$$\Gamma(\Delta \mathbf{r}) = \frac{\kappa}{(\lambda f)^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} I(\boldsymbol{\rho}) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f} \Delta \mathbf{r} \boldsymbol{\rho}\right) d\boldsymbol{\rho}. \quad (2.34)$$

Bis auf einen Skalierungsfaktor entspricht die Struktur der räumlichen Kohärenzfunktion somit dem Ortsfrequenzspektrum der Intensitätsverteilung mit den Ortsfrequenzen

$$\mathbf{v} = \frac{\Delta \mathbf{r}}{\lambda f}. \quad (2.35)$$

Im Fraunhoferfall ist es daher prinzipiell möglich, die Struktur der räumlich inkohärenten Quellverteilung auf Basis der gemessenen Kohärenzfunktion mittels einer inversen Fouriertransformation zu rekonstruieren [72].

Auch der Einfluss dünner Transmissionsstrukturen auf Γ kann auf ähnliche Art und Weise dargestellt werden, wie deren Auswirkung auf das Wellenfeld selbst. Die räumliche Kohärenzfunktion Γ_T direkt hinter einer dünnen Struktur mit der Amplitudentransmissionsfunktion T_A ergibt sich nach [29] zu:

$$\Gamma_T(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) T_A^*(\mathbf{r}_1) T_A(\mathbf{r}_2). \quad (2.36)$$

Hierbei kann T_A eine beliebige komplexwertige Funktion sein. Während eine Blende zum Beispiel durch eine rein reelle Transmissionsfunktion beschrieben wird, lässt sich eine dünne Linse als Produkt einer reellen Pupillenfunktion $\mathcal{P}(\mathbf{r})$ mit einem komplexen Phasenterm $\exp\left(-i \frac{\pi}{\lambda f} \mathbf{r}^2\right)$ darstellen [29].

3 Messung der komplexen Kohärenzfunktion

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert wurde, enthält die räumliche Kohärenzfunktion Strukturinformationen über die Quellintensitätsverteilung. Wird Γ beispielsweise im Fernfeld (Fraunhofer-Fall) bestimmt, ist es nach Gleichung 2.33 bzw. 2.34 möglich, die Intensitätsverteilung der räumlich inkohärenten Objektstruktur mithilfe einer inversen Fouriertransformation zu berechnen. Da die Kohärenzfunktion jedoch nicht direkt messbar ist, muss die komplexwertige Funktion mittels interferometrischer Verfahren indirekt ermittelt werden.

Um eine große Objektähnlichkeit der rekonstruierten Intensitätsverteilung zu erreichen, ist es notwendig, das Ortsfrequenzspektrum möglichst dicht und mit einer großen Bandbreite an Ortsfrequenzen zu erfassen. Dies bedeutet, dass die räumliche Kohärenzfunktion für sehr viele Korrelationsvektoren $\Delta\mathbf{r}$ bestimmt werden muss. Im Fall des klassischen Youngschen Doppelspalts beispielsweise kann die Position und Ausrichtung des Doppelspalts im Raum einem $\Delta\mathbf{r}$ zugeordnet werden. Zur hochaufgelösten Vermessung der räumlichen Kohärenzfunktion müssten somit entsprechend viele Einstellungen am Spalt vorgenommen werden, wodurch dieses Verfahren für praxisnahe Anwendungen nicht geeignet ist.

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels wird daher auf die Shearing-Interferometrie eingegangen, mit welcher die Kohärenzfunktion deutlich effektiver bestimmt werden kann. Im Anschluss daran wird beschrieben, wie aus den gewonnenen Interferogrammen die komplexwertige Kohärenzfunktion berechnet werden kann. Hierbei sind der quasi-monochromatische und der polychromatische Fall zu unterscheiden.

3.1 Shearing-Interferometrie

Das Grundprinzip eines Shearing-Interferometers besteht darin, die zu vermessende Wellenfront $E(\mathbf{r}, t)$ mittels Amplitudenaufteilung [48] in zwei Wellenfronten $E_1(\mathbf{r}_1, t)$ und $E_2(\mathbf{r}_2, t + \tau)$ aufzuteilen und diese am Ausgang des Interferometers wieder auf geeignete Art und Weise miteinander zu überlagern. Je nach Typ des Shearing-Interferometers werden $E_1(\mathbf{r}_1, t)$ und $E_2(\mathbf{r}_2, t + \tau)$ dabei beispielsweise zueinander lateral verschoben, verdreht oder unterschiedlich skaliert. Dadurch ist es auf Basis von Gleichung 2.22 und Gleichung 2.24 (Seite 13) möglich, die räumliche Kohärenzfunktion $\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \tau)$ aus der Messung der Intensität $I(\mathbf{r})$ in der Korrelationsebene zu bestimmen. Während auf konkrete Techniken zur Bestimmung der komplexwertigen Kohärenzfunktion in Kapitel 3.3 eingegangen wird, werden im

Folgenden zunächst drei Typen von Shearing-Interferometern vorgestellt. Da die Laufzeitdifferenz τ für diese Betrachtungen nicht relevant ist, wird die Zeitabhängigkeit der elektrischen Feldstärken dafür nicht mit angegeben.

3.1.1 Lateral-Shearing-Interferometer

Beim *lateralen Shearing-Interferometer* werden zwei zueinander verschobene Wellenfelder $E_1(\mathbf{r}_1)$ und $E_2(\mathbf{r}_2 = \mathbf{r}_1 + \Delta\mathbf{r})$ miteinander überlagert [73]. Der Korrelationsvektor $\Delta\mathbf{r} = \mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1$ gibt an, welche Punkte aus dem Wellenfeld $E(\mathbf{r})$ durch die Superposition von E_1 und E_2 miteinander korreliert werden. Er ist bei diesem Interferometer somit im gesamten Korrelationsgebiet identisch. Folglich kann nach Gleichung 2.35 (Seite 16) für jeden eingestellten lateralen Versatz im Fernfeld nur eine einzelne Ortsfrequenz ν bestimmt werden. Dieser Ansatz eignet sich daher nicht für die Rekonstruktion komplexer Objektstrukturen.

3.1.2 Radial-Shearing-Interferometer

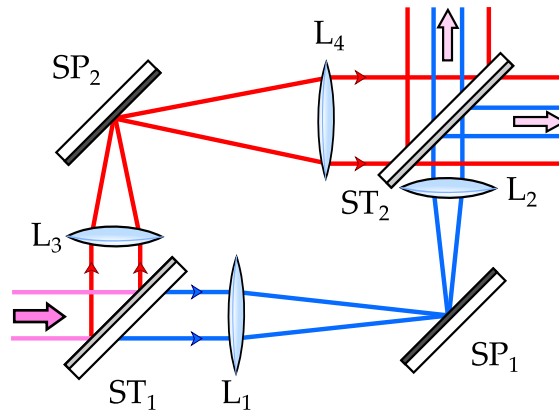


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Radial-Shearing-Interferometers auf Basis eines Mach-Zehnder-Interferometers. Die Abbildungsmaßstäbe sind gegeben durch $M_1 = f_{L2}/f_{L1}$ und $M_2 = f_{L4}/f_{L3}$. (ST - Strahlteiler, L - Linsen, SP - Spiegel)

Beim *Radial-Shearing-Interferometer* (RadSI) werden zwei unterschiedlich skalierte Kopien der Wellenfront $E(\mathbf{r})$ miteinander überlagert [74]. Eine mögliche Realisierung eines solchen Interferometers ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Mit den für die Interferometerarme unterschiedlichen Abbildungsmaßstäben $M_1 = f_{L2}/f_{L1}$ und $M_2 = f_{L4}/f_{L3}$ ergeben sich die skalierten Ortsvektoren der beiden Amplitudenverteilungen E_1 und E_2 zu $\mathbf{r}_1 = M_1\mathbf{r}$ und $\mathbf{r}_2 = M_2\mathbf{r}$. Es gilt daher:

$$\begin{aligned}\Delta\mathbf{r} &= \mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1 \\ &= (M_2 - M_1)\mathbf{r}.\end{aligned}\tag{3.1}$$

Der Wert der Kohärenzfunktion am Ort \mathbf{r} in der Korrelationsebene beträgt somit:

$$\Gamma(\mathbf{r}) = \Gamma\left(\frac{\Delta\mathbf{r}}{M_2 - M_1}\right).\tag{3.2}$$

Wird ein ortsauflösender Detektor verwendet, ist es mit diesem Interferometertyp demnach möglich, die räumliche Kohärenzfunktion gleichzeitig für verschiedene $\Delta \mathbf{r}$ zu bestimmen, ohne den Aufbau verändern zu müssen. Aus Gleichung 3.2 wird aber auch deutlich, dass die Kohärenzfunktion mit diesem Interferometer nicht vollständig ermittelt werden kann. Statt der vierdimensionalen Funktion $\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$ wird damit nur ein zweidimensionaler Funktionsunterraum $\Gamma(\Delta \mathbf{r})$ erhalten. Unter Fernfeldbedingungen (Gleichung 2.34, Seite 16) genügt dieser jedoch für die Rekonstruktion der Quellintensitätsverteilung [110].

3.1.3 Rotations-Shearing-Interferometer

Mit dem *Rotations-Shearing-Interferometer* (RSI) [75, 76] existiert eine weitere Möglichkeit, Γ gleichzeitig für verschiedene Korrelationsabstände zu ermitteln. Hier wird die zu vermessende Wellenfront $E(\mathbf{r})$ unter einem Shear-Winkel Ψ mit sich selbst überlagert. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird die Rotation der beiden interferierenden Wellenfronten $E_1(\mathbf{r}_1)$ und $E_2(\mathbf{r}_2)$ im Folgenden als Drehung von $E(\mathbf{r})$ um $-\Psi/2$ bzw. um $+\Psi/2$ behandelt⁷ (Abbildung 3.2.a). Der Korrelationsvektor ergibt sich demnach zu:

$$\Delta \mathbf{r} = \mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1 = \begin{pmatrix} 2y \\ 2x \end{pmatrix} \sin(\Psi/2). \quad (3.3)$$

Durch die Messung der Kohärenzfunktion mit einem RSI findet daher ebenfalls eine Reduktion von vier auf zwei Dimensionen statt. Die Definition des Korrelationsvektors ist jedoch eine andere als beim RadSI, wodurch sich auch die mit den beiden Interferometern bestimmbaren Kohärenzfunktionen unterscheiden. $\Gamma_{\text{RSI}}(\mathbf{r})$ entspricht somit einem anderen Funktionsunterraum von $\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$ als $\Gamma_{\text{RadSI}}(\mathbf{r})$.

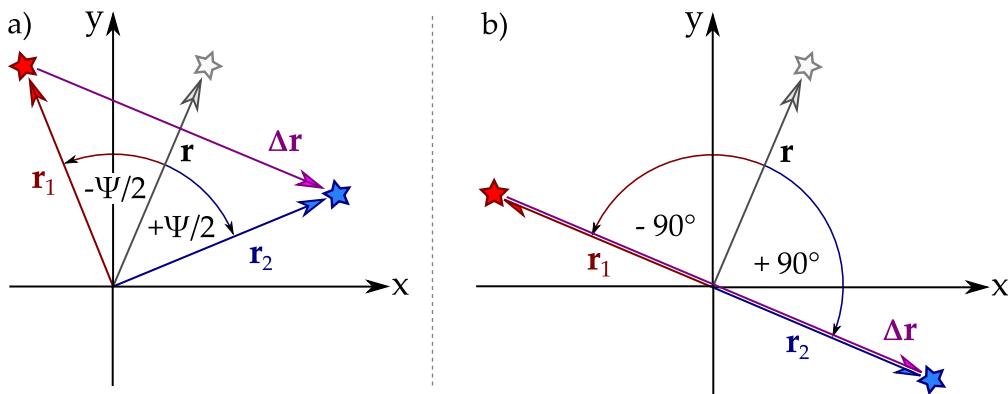


Abbildung 3.2: a) RSI ($\Psi \neq 180^\circ$) b) BII ($\Psi = 180^\circ$). Ein Punkt der Wellenfront E am Ort \mathbf{r} wird am Ausgang des RSI an die Orte \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 abgebildet. Der Differenzvektor $\Delta \mathbf{r}$ ist aufgrund der Drehung um $-\Psi/2$ bzw. $+\Psi/2$ senkrecht zu \mathbf{r} orientiert und um den Faktor $2 \sin(\Psi/2)$ skaliert.

⁷ Hierbei handelt es sich um eine in der entsprechenden Literatur übliche Koordinatentransformation, durch welche sich die mathematische Behandlung vereinfacht.

Das *bildinvertierende Interferometer* (BII) stellt einen Spezialfall des RSI mit einem Shearwinkel von 180° dar (Abbildung 3.2.b). Die sich überlagernden Wellenfelder am Ausgang des RSI sind folglich räumlich zueinander invertiert, und es gilt $E_1(\mathbf{r}_1) = E_2(-\mathbf{r}_2)$. Aufgrund der Definition der Kohärenzfunktion (Gleichung 2.23, Seite 13) folgt daraus, dass zur Inversionsachse symmetrische Anteile der Wellenfront keinen Einfluss auf die so messbare Kohärenzfunktion haben. Da die Informationen über die axiale Position eines Punkts im Raum nach Gleichung 2.3 (Seite 7) einer quadratischen Wellenfrontkrümmung entspricht, wird die Tiefeninformation durch die so gemessene zweidimensionale Kohärenzfunktion nicht erfasst. Nach Gleichung 3.3 beträgt der Korrelationsabstand $\Delta r = |\Delta \mathbf{r}|$ beim bildinvertierenden Interferometer $2|\mathbf{r}|$ und ist somit doppelt so groß wie der Betrag des Ortsvektors \mathbf{r} . Das BII eignet sich demnach besonders gut für die hochaufgelöste Messung der räumlichen Kohärenzfunktion über einen großen Korrelationsbereich [77].

3.1.4 Maximaler Korrelationsabstand

Der Korrelationsabstand Δr ist ein Maß für die Entfernung der mithilfe des Interferometers korrelierten Punkte auf der Wellenfront $E(\mathbf{r})$. Aufgrund der räumlichen Begrenzung⁸ von $E_{1,2}$ kann die Kohärenzfunktion nur in einem eingeschränkten Bereich der Korrelationsebene ermittelt werden. Durch den maximal möglichen Korrelationsabstand wird somit nach Gleichung 2.35 (Seite 16) die Bandbreite des durch die Kohärenzfunktion repräsentierten Ortsfrequenzspektrums bestimmt. Daher wird dieser Aspekt in den nachfolgenden Abschnitten für das RadSI und das RSI genauer untersucht. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Amplitudenverteilung $E(\mathbf{r})$ am Eingang des Interferometers durch eine runde Apertur mit dem Radius R begrenzt ist und durch die freie Öffnung des Interferometers nicht weiter abgeschattet wird.

Radial-Shearing-Interferometer

Beim Radial-Shearing-Interferometer sind am Ausgang des Interferometers zwei Wellenfronten $E_1(\mathbf{r}_1)$ und $E_2(\mathbf{r}_2)$ mit den Radien $R_1 = M_1 R$ und $R_2 = M_2 R$ beobachtbar. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird an dieser Stelle davon ausgegangen, dass $M_1 = 1/M_2 = M_{\text{RadSi}}$ mit $M_{\text{RadSi}} > 1$ gilt. Interferenzen können jedoch nur im Überlappungsbereich dieser Wellenfelder gemessen werden, welcher einen Radius von $R_{\text{kor}} = R/M_{\text{RadSi}}$ aufweist. Mit Gleichung 3.1 ergibt sich der Korrelationsabstand auf $E(\mathbf{r})$ demnach zu:

$$\Delta r = |\mathbf{r}| (M_{\text{RadSi}} - 1/M_{\text{RadSi}}). \quad (3.4)$$

⁸ Ursachen hierfür können beispielsweise vor dem Interferometer liegende Blenden, die effektive Apertur des Interferometers selbst oder aber die endliche Ausdehnung des Detektors sein.

Durch das Einsetzen von $|\mathbf{r}| = R_{\text{kor}}r$ in Gleichung 3.4, ist es möglich, den maximalen Korrelationsabstand Δr_{max} zu ermitteln, welcher mithilfe eines Radial-Shearing-Interferometers erreicht werden kann:

$$\Delta r_{\text{max}} = R \left(1 - 1/M_{\text{RadSi}}^2 \right). \quad (3.5)$$

Während die Abbildungen 3.3.a) und b) diesen Sachverhalt für zwei verschiedene Abbildungsmaßstäbe veranschaulichen, stellt Abbildung 3.3.c) den Verlauf des maximalen Korrelationsabstandes Δr_{max} in Abhängigkeit von M_{RadSi} dar.

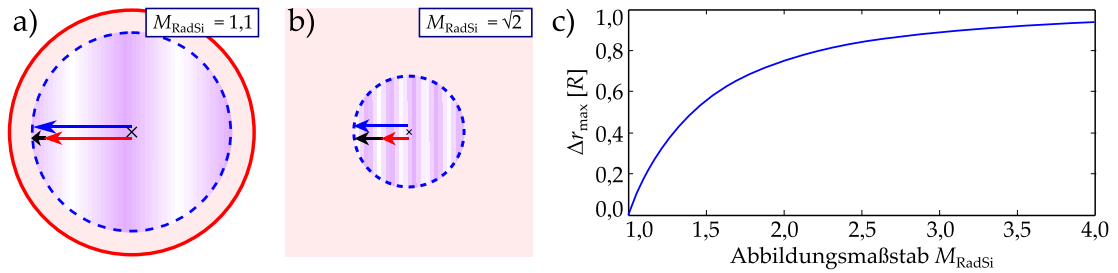


Abbildung 3.3: a) & b) Im Überlappungsbereich der vergrößerten (rot) und verkleinerten (blau gestrichelt) Wellenfront können Interferenzen beobachtet werden (violett). Zur Veranschaulichung wurden die Interferogramme für eine leicht verkippte ebene Wellenfront E dargestellt. Der Ortsvektor eines Punkts \mathbf{r}_2 am Rand des verkleinerten Wellenfeldes ist beispielhaft durch die blauen Pfeile markiert. Der mit diesem Punkt \mathbf{r}_2 korrelierte Punkt \mathbf{r}_1 auf dem vergrößerten Wellenfeld befindet sich, in die verkleinerte Wellenfront projiziert, an dem durch den roten Pfeil markierten Ort. Der daraus resultierende Korrelationsvektor $\Delta \mathbf{r} = \mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1$ ist schwarz dargestellt. c) Verlauf von $\Delta r_{\text{max}}(M_{\text{RadSi}})$ in Einheiten von R .

Rotations-Shearing-Interferometer

Beim Rotations-Shearing-Interferometer ist der Abbildungsmaßstab in beiden Armen identisch; die sich überlagernden Wellenfelder sind jedoch um den Shearwinkel Ψ zueinander gedreht. Nach Gleichung 3.3 stellt $2 \sin(\Psi/2)$ einen Skalierungsfaktor für den Korrelationsvektor $\Delta \mathbf{r}$ dar und damit auch für den maximalen Korrelationsabstand:

$$\Delta r_{\text{max}}(\Psi) = 2R \sin(\Psi/2). \quad (3.6)$$

Die Abbildungen 3.4.a) und 3.4.b) verdeutlichen den Einfluss des Shearwinkels auf die Interferenzmuster am Ausgang eines RSI. Für diese Darstellung wurde $E(\mathbf{r})$ wieder als ebene Welle angenommen, welche den gleichen Winkel zur optischen Achse hat wie im vorangegangenen Beispiel. Bei $\Psi = 30^\circ$ können im Überlappungsbereich des RSI somit ebenso viele Interferenzstreifen beobachtet werden wie beim Einsatz eines RadSI mit $M_{\text{RadSi}} = \sqrt{2}$. Abbildung 3.4.c) stellt die Abhängigkeit des maximalen Korrelationsabstandes vom Shearwinkel dar. Der Vergleich mit Abbildung 3.3.c) verdeutlicht den Vorteil des RSI gegenüber dem RadSI. Während der

größtmögliche Korrelationsabstand für das RadSI bei R liegt⁹, ist er beim RSI mit $2R$ doppelt so groß. Nach Gleichung 2.35 (Seite 16) ist die Bandbreite des mithilfe eines bildinvertierenden Interferometers bestimmbaren Ortsfrequenzspektrums daher auch doppelt so groß wie die mit einem RadSI nutzbare Bandbreite.

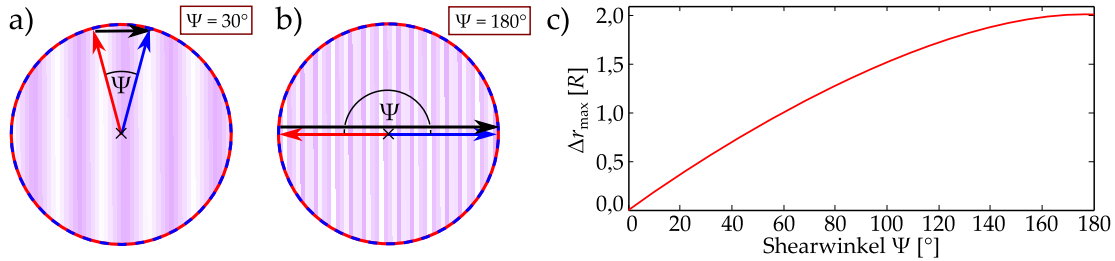


Abbildung 3.4: a) & b) Die um $+\Psi/2$ (rot) und $-\Psi/2$ (blau gestrichelt) gedrehten Wellenfelder überlagern sich am Ausgang des RSI vollständig, wodurch jeder Punkt der Wellenfront mit einem anderen korreliert wird. Der Ortsvektor \mathbf{r}_2 eines Punkts am Rand der um $+\Psi/2$ gedrehten Amplitudenverteilung und der mit ihm korrelierte Punkt bei \mathbf{r}_1 des um $-\Psi/2$ gedrehten Wellenfeldes sind durch die blauen bzw. roten Pfeile markiert. Der resultierende Korrelationsvektor $\Delta \mathbf{r}$ ist jeweils als schwarzer Pfeil dargestellt. Zur Berechnung des Interferenzmusters (violett gestreift) wurde von der gleichen einfallenden Wellenfront $E(\mathbf{r})$ wie in Abbildung 3.3 ausgegangen. c) Verlauf von $\Delta r_{\max}(\Psi)$ in Einheiten von R .

3.2 Mögliche Realisierungen eines bildinvertierenden Interferometers

Ein bildinvertierendes Interferometer kann durch verschiedene Aufbauten realisiert werden. Vier mögliche Umsetzungen, zu welchen im Rahmen dieser Arbeit Erfahrungen gesammelt wurden, sind in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt.

Abbildung 3.5.a) zeigt ein Mach-Zehnder-Interferometer, in dessen einem Arm die Wellenfront mithilfe eines Linsenteleskops räumlich invertiert wird. Bei der Verwendung von nicht-monochromatischem Licht kann es mit diesem Aufbau allerdings durch Dispersionseffekte zu einer starken Verminderung des Interferenzkontrasts kommen [78]. Durch den Einsatz einer auf das Teleskop abgestimmten Kompensationsplatte kann der Einfluss der Dispersion aber reduziert werden. Eine weitere Möglichkeit hierfür besteht darin, das Linsenteleskop durch ein achromatisches Spiegelteleskop zu ersetzen. Als Folge dessen können jedoch zusätzliche Aberrationen induziert werden, welche die Abbildungsqualität mindern [79].

Ein weiteres BII auf Basis eines Mach-Zehnder-Interferometers ist in Abbildung 3.5.b) dargestellt. Die Bildinversion geschieht hier durch zwei Dove-Prismen,

⁹ Nach Gleichung 3.5 wird $\Delta r = R$ erst für $M_{\text{RadSi}} \rightarrow \infty$ erreicht. In diesem Fall gilt für den Überlappungsbereich jedoch $R_{\text{kor}} \rightarrow 0$, weswegen große Abbildungsmaßstäbe in der Praxis zu nicht auswertbaren Interferenzen führen.

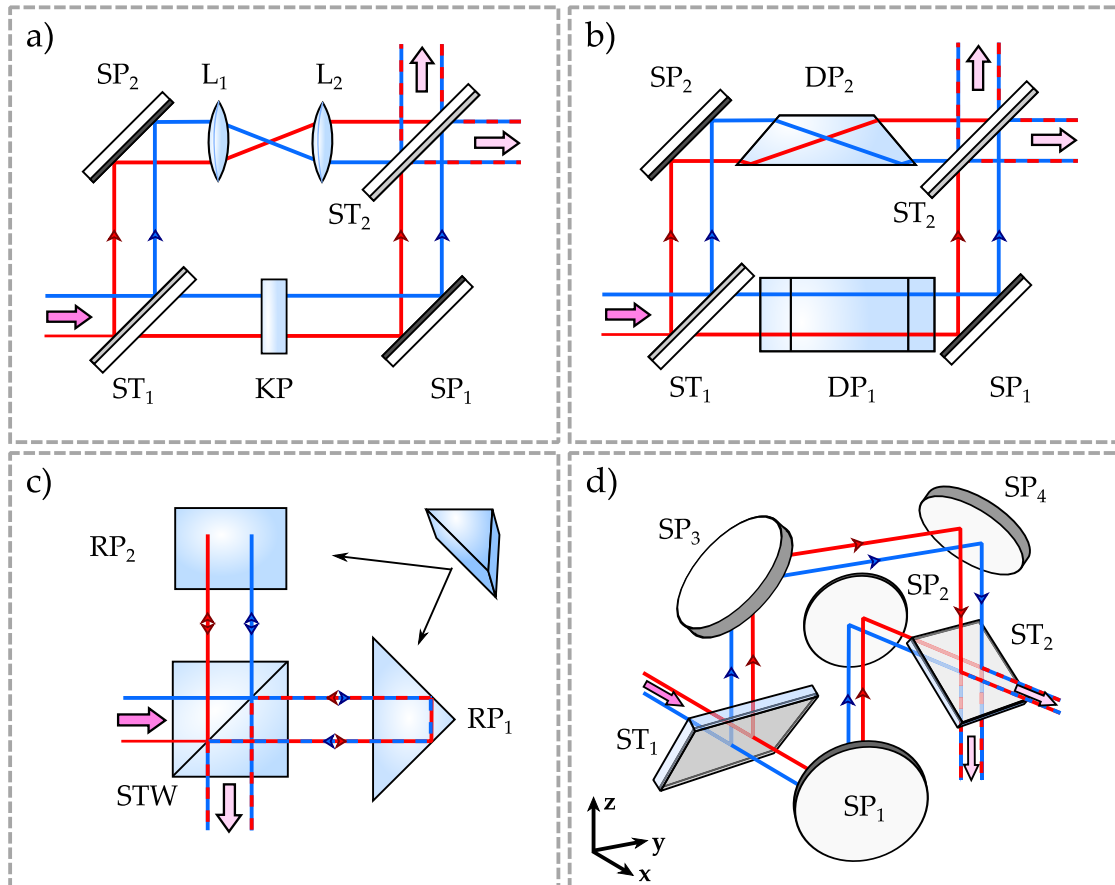


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung vier verschiedener bildinvertierender Interferometer. a) Mach-Zehnder-Interferometer mit einem Teleskop zur Bildinversion. b) Mach-Zehnder-Interferometer mit zwei um 90° zueinander gedrehten Dove-Prismen. c) Michelson-Interferometer mit zwei um 90° gedrehten rechtwinkligen Prismen. d) UZ-Interferometer. (ST - Strahlteiler, SP - Spiegel, L - Linse, KP - Kompensationsplatte, DP - Dove-Prisma, RP - rechtwinkliges Prisma, STW - Strahlteilerwürfel)

welche um 90° zueinander gedreht sind. Dieser Interferometertyp wird daher im Folgenden als *Dove-Prismen-Interferometer* (DPI) bezeichnet. Die Drehung der Prismen um 90° führt dazu, dass die einlaufende Wellenfront in einem Arm um die vertikale Achse gespiegelt wird und im anderen um die horizontale. Die beiden auslaufenden Wellenfelder sind folglich um 180° zueinander gedreht. Da sich in jedem Arm ein Dove-Prisma befindet, stellt die Dispersion bei diesem Interferometer ein untergeordnetes Problem dar. Schwerwiegender ist, dass durch die Brechung im Prisma Aberrationen induziert werden [80]. Es besteht jedoch die Möglichkeit, solche Aberrationen mittels einer Anordnung von Planspiegeln [81], welche den Strahlengang der Prismen nachbilden, zu vermeiden.

Das in Abbildung 3.5.c) gezeigte BII basiert auf einem Michelson-Interferometer, dessen Arme durch um 90° zueinander gedrehte rechtwinklige Prismen abgeschlossen sind. Die Bildinversion geschieht hier folglich wie beim DPI über die vertikale bzw. horizontale Spiegelung der Wellenfronten in jeweils einem der beiden Inter-

ferometerarme. Werden die Prismen durch rechtwinklig angeordnete Planspiegel ersetzt, ist es auch hier möglich, die durch die Brechung im Glaskörper verursachten Aberrationen zu vermeiden. Während bei den zuvor genannten Interferometern beide Ausgänge zur Verfügung stehen, ist dies beim Michelson-Interferometer nicht ohne Weiteres der Fall. Die Messung des Interferogramms an beiden Ausgängen kann allerdings Vorteile bieten, da es so beispielsweise möglich ist, das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) der Objektrekonstruktion zu verbessern (Kapitel 5.8.2).

Bei einem sogenannten *UZ-Interferometer* [82] handelt es sich um ein dreidimensional angeordnetes Zweistrahlinterferometer, bei welchem die Bildinversion durch Planspiegel realisiert wird. In Abbildung 3.5.d) ist ein solches Interferometer schematisch dargestellt. Am Strahlteiler ST_1 wird das einlaufende Wellenfeld auf den U- und den Z-Arm aufgeteilt. Den unteren, Z-förmigen Arm des Interferometers durchläuft die Amplitudenverteilung über die Spiegel SP_1 und SP_2 unverändert. Am Strahlteiler ST_2 kommt es dann zur Überlagerung mit der Amplitudenverteilung aus dem U-förmigen Arm. Diese ist aufgrund der Anordnung der Spiegel SP_3 und SP_4 räumlich invertiert. Mit Ausnahme der Strahlteiler besitzt dieses Interferometer keine dispersiven Elemente und durch Planspiegel hoher Güte können Aberrationen der Wellenfront minimiert werden. Aufgrund des dreidimensionalen Aufbaus erweist sich das UZ-Interferometer in der Praxis jedoch als störanfälliger und aufwendiger zu justieren als ein zweidimensionaler Aufbau [83].

3.3 Bestimmung der komplexwertigen räumlichen Kohärenzfunktion

Wie in Kapitel 2 erwähnt, kann die komplexe Kohärenzfunktion nicht direkt gemessen werden. Da der Interferenzterm einer Intensitätsverteilung jedoch dem Realteil der Kohärenzfunktion entspricht, ist deren indirekte Bestimmung möglich. Mithilfe geeigneter Techniken lässt sich aus dem Interferenzmuster sowohl der Betrag als auch die Phase der Kohärenzfunktion berechnen.

3.3.1 Quasi-monochromatischer Fall

Kommt quasi-monochromatisches Licht ($\Delta\lambda \ll \lambda$) zum Einsatz, ist es möglich, Γ durch nur wenige Interferogramme zu bestimmen. Hierbei ist es egal, ob die Objektstruktur räumlich inkohärent beleuchtet wird oder ob es sich um entsprechend selbstleuchtende Strukturen handelt. Die Bestimmung des Betrags und der Phase eines Interferogramms ist ein bekanntes Problem der Interferometrie, welches bereits vielfach diskutiert wurde (z.B. von Creath [84]). Ohne weitere Vorkenntnisse benötigt man hierzu mindestens drei Interferogramme bei jeweils ver-

schiedenen Phasenlagen¹⁰, um die Kohärenzfunktion eindeutig zu ermitteln [85]. Im Fall bekannter, äquidistanter Phasenschritte ist es möglich, Betrag und Phase der komplexwertigen Funktion durch grundlegende Rechenoperationen zu bestimmen. Hier wären beispielsweise die Drei- [86, 87], Vier- [88, 89] und Fünf-Schritt-Verfahren [90, 91] zu nennen. Mithilfe von Gleichung 3.7 kann die Phase ϕ von Γ beispielsweise aus drei Interferogrammen I_1 , I_2 und I_3 gewonnen werden, deren Phasenlagen φ sich um jeweils $\pi/2$ unterscheiden [86].

$$\phi = \arctan\left(\frac{I_3 - I_2}{I_1 - I_2}\right) \quad (3.7)$$

Neben diesen simplen Verfahren gibt es auch Algorithmen, bei denen die Phasenschritte unbekannt, aber äquidistant [92, 93] oder vollkommen beliebig sein dürfen. Zu letzteren zählt beispielsweise der *Advanced Iterative Algorithm* [94], welcher mindestens drei verschiedene Interferogramme benötigt und im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kam.

Es existieren bereits verschiedene Ansätze, welche es ermöglichen, durch die gleichzeitige Aufnahme mehrerer Interferogramme alle notwendigen Informationen zur Bestimmung der komplexen Kohärenzfunktion zu erhalten. Dies hat den Vorteil, dass sich die Aufnahmezeit deutlich reduzieren lässt. Durch die Ausnutzung beider Ausgänge des Interferometers sowie der Symmetrieeigenschaften der Fouriertransformation einer räumlich inkohärenten Struktur (reelle Funktion¹¹) kann Γ beispielsweise durch ein sogenanntes *Quadrature-Phase RSI* bestimmt werden [96, 97]. Hierfür genügen zwei Interferogramme, welche simultan an den beiden Ausgängen des Interferometers aufgenommen werden können. Eine weitere Möglichkeit stellt ein BII auf Basis eines Dreifach-Strahlteilers dar, wie er unter anderem beim iPALM-Verfahren [11] zum Einsatz kommt. Ein solches Interferometer besitzt drei Ausgänge, an welchen um jeweils $2\pi/3$ zueinander phasenverschobene Interferogramme beobachtbar sind. Das Ziel dieser Arbeit war es, die grundlegenden Abbildungseigenschaften eines bildinvertierenden Weitfeldmikroskops zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden solche Ansätze zur Optimierung der Aufnahmegeschwindigkeit nicht weiter verfolgt.

3.3.2 Polychromatischer Fall

Ist die quasi-monochromatische Näherung nicht erfüllt, kann die räumliche Kohärenzfunktion Γ_λ für eine bestimmte Wellenlänge λ mithilfe von Methoden aus der Fourier-Spektroskopie [98–100] bestimmt werden. Bezüglich der Bild-

¹⁰ Die Phasenlagen φ der Interferogramme können beispielsweise durch eine Weglängendifferenz zwischen den beiden Interferometerarmen (z.B. Piezo-Aktuator) oder durch Phasenelemente (z.B. Flüssigkristallelement) variiert werden.

¹¹ Für reelle Funktionen $f(x)$ gilt [95]: $F(-\omega) = F^*(\omega)$. F stellt hierbei die Fouriertransformierte von f dar, und $*$ symbolisiert die komplexe Konjugation.

gebung auf Basis der Kohärenzfunktion existieren bereits mehrere Ansätze, um Objektrekonstruktionen dadurch auch mit breitbandigem Licht zu ermöglichen [35, 41, 43, 101]. Zwischen den Interferometerarmen wird hierbei eine optische Weglängendifferenz $\Delta\zeta_{\text{IF}}$ abgefahren und dabei J Interferogramme aufgenommen. Anschließend wird der so gewonnene Bilderstapel $B(\mathbf{r}, \Delta\zeta_{\text{IF}})$ entlang der $\Delta\zeta_{\text{IF}}$ -Achse numerisch fouriertransformiert, wodurch man für jede Pixelkoordinate \mathbf{r} des Bilderstapels ein Wellenzahl- bzw. Wellenlängenspektrum mit insgesamt J Werten erhält. Wie in der entsprechenden Literatur [35, 41, 43, 101] bereits ausführlich diskutiert, entsprechen die Ebenen des fouriertransformierten Bilderstapels den quasi-monochromatischen räumlichen Kohärenzfunktionen $\Gamma_{\lambda_j}(\mathbf{r}, -\mathbf{r})$. Dadurch wird es möglich, das Verfahren des *coherence imaging* selbst bei Verwendung von breitbandigem Licht auf den quasi-monochromatischen Fall zurückzuführen. Abbildung 3.6 veranschaulicht das Funktionsprinzip dieses Ansatzes. Da die auf-

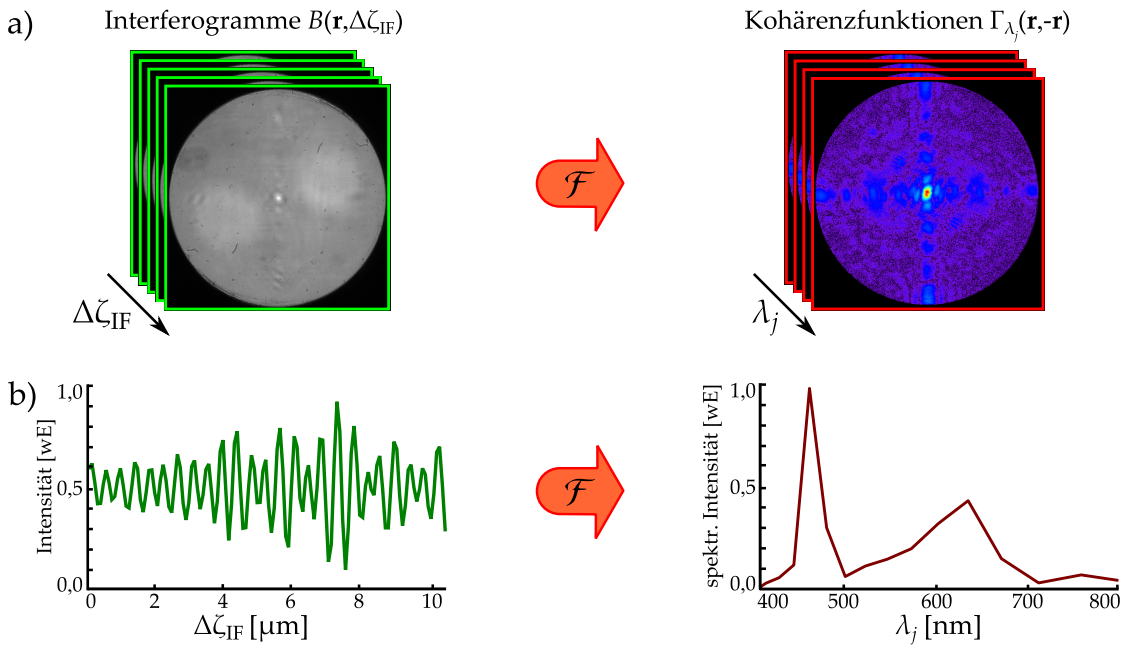


Abbildung 3.6: a) Aus den J aufgenommenen Interferogrammen $B(\mathbf{r}, \Delta\zeta_{\text{IF}})$ lassen sich mittels einer Fouriertransformation insgesamt $J/2 + 1$ unterschiedliche Kohärenzfunktionen $\Gamma_{\lambda_j}(\mathbf{r}, -\mathbf{r})$ berechnen. b) stellt beispielhaft den Intensitätsverlauf für das zentrale Pixel des oben gezeigten Bilderstapels dar sowie das sich daraus ergebende Spektrum.

genommenen Interferogramme rein reell sind, enthalten beide Seiten des Spektrums die gleichen Informationen [95]. Für die Auswertung stehen daher effektiv nur $J/2 + 1$ unterschiedliche Werte zur Verfügung. Die jeweiligen Wellenlängen ergeben sich mit $j = [0, J/2]$ aus dem maximalen optischen Weglängenunterschied $\Delta\zeta_{\text{max}}$ durch:

$$\lambda_j = \frac{\Delta\zeta_{\text{max}}}{j}. \quad (3.8)$$

Diese Methode zur Bestimmung von Γ_{λ_j} besitzt dieselben Eigenschaften wie die klassische Fourier-Spektroskopie. So ist die kürzeste nachweisbare Wellenlänge λ_{\min} beispielsweise durch den Abstand $\delta\zeta = \Delta\zeta_{\max}/J$ der Sampling-Punkte bestimmt. Nach dem Nyquist-Theorem [99] ergibt sie sich zu:

$$\lambda_{\min} = 2\delta\zeta . \quad (3.9)$$

Das spektrale Auflösungsvermögen $\lambda/\Delta\lambda$ eines solchen Fourier-Spektrometers lässt sich nach Gleichung 3.10 [99, 102] berechnen. Es ist sowohl von der Wellenlänge als auch vom maximalen Verstellweg $\Delta\zeta_{\max}$ abhängig.

$$\frac{\lambda}{\Delta\lambda} = \frac{\Delta\zeta_{\max}}{\lambda} . \quad (3.10)$$

3.4 Zusammenfassung

Sowohl das Radial- als auch das Rotations-Shearing-Interferometer bietet die Möglichkeit, die komplexwertige räumliche Kohärenzfunktion einer Quellverteilung mit einer großen Anzahl und Dichte von Sampling-Punkten zu bestimmen.

Der Korrelationsabstand innerhalb des auswertbaren Wellenfeldes ist beim RadSI abhängig vom gewählten Abbildungsmaßstab M_{RadSi} . Der größtmögliche Korrelationsabstand Δr_{\max} entspricht bei diesem Interferometer dem Radius R des Wellenfeldes und wird erst für $M_{\text{RadSi}} \rightarrow \infty$ erreicht. Mithilfe eines bildinvertierenden Interferometers (RSI mit $\Psi = 180^\circ$) hingegen kann ein Korrelationsabstand von $2R$ realisiert werden. Die Bandbreite des Ortsfrequenzspektrums, welches durch eine so gemessene räumliche Kohärenzfunktion übertragen wird, ist demnach mindestens doppelt so groß wie unter Verwendung eines RadSI. Da der Abstand zweier Punkte innerhalb des begrenzten Wellenfeldes nicht größer als $2R$ sein kann, ist die Ortsfrequenzbandbreite der mithilfe eines BII bestimmten räumlichen Kohärenzfunktion maximal. Während die mit dem RadSI ermittelte Kohärenzfunktion Informationen über die dreidimensionale Struktur der Probe enthält, entfallen die Tiefeninformationen bei der Messung durch ein BII aus Symmetriegründen vollständig. Wie in Kapitel 5 gezeigt wird, ist es dadurch jedoch möglich, eine Objektrekonstruktion mit quasi unendlicher Schärfentiefe zu erhalten.

Um die komplexwertige räumliche Kohärenzfunktion aus den aufgenommenen Interferogrammen zu bestimmen, existieren verschiedene etablierte Ansätze. Unter quasi-monochromatischen Bedingungen genügen hierfür bereits drei Interferogramme. Im polychromatischen Fall kann das BII zudem als Fourier-Spektrometer betrieben werden. Dadurch ist es möglich, aus aufgenommenen Interferogrammen mehrere Kohärenzfunktionen zu berechnen, welche verschiedenen Wellenlängen λ_j zugeordnet werden können.

4 Laboraufbau des bildinvertierenden Interferometers

Alle im Folgenden vorgestellten Messungen und Ergebnisse wurden ausschließlich mit dem in Abbildung 4.1 gezeigten bildinvertierenden Interferometer auf Basis eines Mach-Zehnder-Aufbaus gewonnen. Die Bildinversion wurde nach dem in Kapitel 3.2 dargestellten Schema eines DPI mithilfe von zwei um 90° zueinander gedrehten Dove-Prismen erzeugt (siehe Abbildung 3.5.b), Seite 23). Das einlaufende Wellenfeld wird hierbei am Strahlteiler ST_1 aufgespalten und durchläuft daraufhin die beiden Arme des Interferometers. Als Strahlteiler wurden zwei planparallele Glasplatten mit einem Durchmesser von 50 mm und einer Dicke von 10 mm verwendet. Um das Interferometer in einem möglichst großen Bereich des optischen Spektrums betreiben zu können, wurden die Glasplatten mit einer breitbandigen 50/50-Verspiegelung beschichtet. Zur Vermeidung von Reflexen an der Rückseite der Strahlteiler kam dort zudem eine ebenfalls breitbandige Anti-Reflexbeschichtung zum Einsatz.

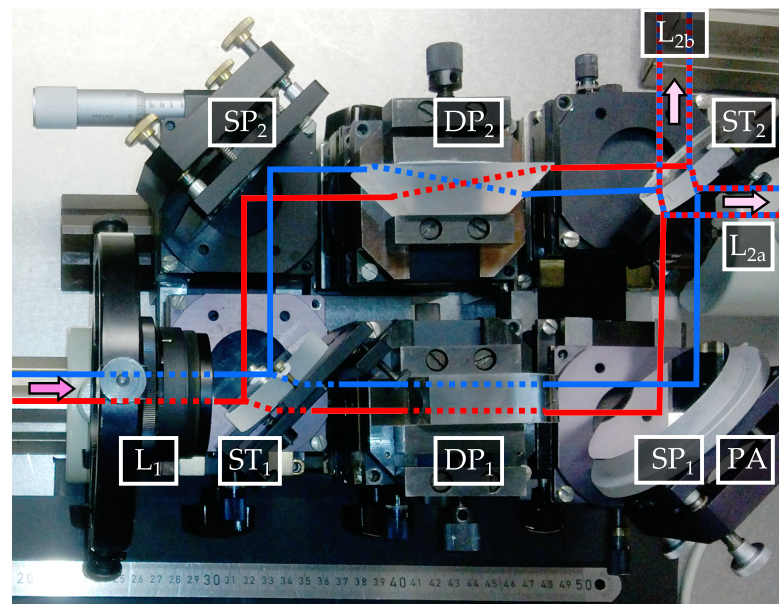


Abbildung 4.1: Fotografie des Laboraufbaus des bildinvertierenden Interferometers. (ST – Strahlteiler, SP – Spiegel, PA – Piezo-Aktuator, DP – Dove-Prisma, L – Objektiv)

Die verwendeten Dove-Prismen der Firma *Edmund Optics* besitzen eine freie Apertur von $20\text{ mm} \times 20\text{ mm}$ sowie eine Basislänge von $81,30\text{ mm}$. Zur Vermeidung parasitärer Reflexe wurde auch hier eine VIS-Anti-Reflex-Beschichtung verwendet. Mittels eines Piezo-Aktuators (*Queensgate*, DPT-C-S) am Spiegel SP_1 konnte zwischen den beiden Interferometerarmen eine optische Weglängendifferenz eingestellt werden. Dadurch war es möglich, sowohl das Phasen-Schritt- als auch das

spektrometrische Verfahren zur Messung der komplexen Kohärenzfunktion zu verwenden (Abschnitt 3.3, Seite 24). Die maximale, durch den Piezo-Aktuator einstellbare, optische Wegdifferenz $\Delta\zeta_{\max}$ betrug ca. $14\text{ }\mu\text{m}$. Für eine mittlere Wellenlänge von beispielsweise 633 nm ergibt sich daraus nach Gleichung 3.10 (Seite 27) ein maximales spektrales Auflösungsvermögen von ca. 44.

Für die Messung der komplexen Kohärenzfunktion wurde nur der bei Linse L_{2a} befindliche konstruktive Ausgang des Interferometers verwendet. Das Eingangsobjektiv L_1 (*Carl Zeiss Jena*, Tessar 4,5/300 mm) und das Ausgangsobjektiv L_{2a} (*Carl Zeiss Jena*, Tessar 3,5/105 mm) bilden ein teleskopisches System [55]. Hierdurch wird die vordere Brennebene von L_1 durch das BII hindurch in die hintere Brennebene von L_{2a} abgebildet. Mit den Brennweiten $f_1 = 300\text{ mm}$ und $f_{2a} = 105\text{ mm}$ wird ein Abbildungsmaßstab von $M_{\text{IF}} = 0,35$ erzielt. Zur Aufnahme der Interferenzstruktur kam eine CCD-Kamera (*Allied Vision Technologies GmbH*, Pike F-032B) mit einer Auflösung von 640×480 Pixeln und einem Pixelabstand $p_x = 7,4\text{ }\mu\text{m}$ zum Einsatz. Der zweite Ausgang des BII wurde im weiteren Versuchsablauf vorrangig zur Justierung verwendet. Der Abstand zwischen L_1 und L_{2b} (*Carl Zeiss Jena*, Tessar 4,5/150 mm) war so gewählt, dass die Objektebene des Mikroskopobjektivs scharf auf den Sensor der an diesem Ausgang befindlichen CCD-Kamera (*Allied Vision Technologies GmbH*, Pike F-032B) abgebildet wurde.

4.1 Charakterisierung der Systemfehler

Ein Nachteil des verwendeten DPI sind die durch die Dove-Prismen verursachten Wellenfrontdeformationen. Die Ursache hierfür ist die Brechung des Lichts an den Grenzflächen der Prismen, wodurch vor allem Astigmatismen entstehen [80]. Besonders problematisch ist hierbei, dass die Aberrationen aufgrund der unterschiedlichen Lage und Orientierung der Prismen in beiden Armen verschieden sind und zudem vom Einfallswinkel abhängen.

Diese Wellenfrontfehler sowie die Abbildungsfehler der Linsen L_1 und L_2 werden im Folgenden als Systemfehler bezeichnet. Der Einfluss dieser Aberrationen auf das Interferenzbild am Ausgang des Interferometers wurde mithilfe des in Abbildung 4.2 skizzierten Versuchsaufbaus untersucht. Eine in der vorderen Brennebene des Objektivs L_1 platzierte Apertur A wurde hierzu mit einem kollimierten Helium-Neon-Laserbündel (HeNe , $\lambda = 632,8\text{ nm}$) ausgeleuchtet, welches die optische Achse unter einem Winkel $\beta = (\beta_x, \beta_y)^{12}$ schnitt. Aufgrund des Abbildungsmaßstabs $M_{\text{IF}} = 0,35$ fand eine verkleinerte Abbildung des Wellenfeldes auf den hinter L_{2a} befindlichen CCD-Sensor statt. Der Betrag β des Vektors β vergrößerte sich gemäß der Sinusbedingung [48] für den paraxialen Fall zu $\beta' = \beta/M_{\text{IF}}$. Die

¹² $\beta_{x,y}$ - Winkel zwischen optischer Achse und x - bzw. y -Achse

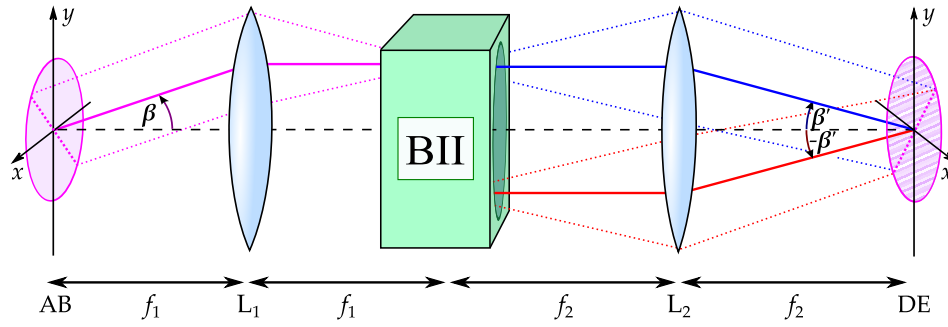


Abbildung 4.2: Skizze des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der winkelabhängigen Systemfehler. (A – Apertur, DE – Detektorebene, L – Linse, f – Brennweite)

räumlich invertierte Kopie des Strahlenbündels schnitt die optische Achse somit unter einem Winkel $-\beta'$, wodurch auf dem Sensor ein Interferenzstreifenmuster mit der Periodenlänge $\Lambda = \lambda / (2 \sin(\beta'))$ zu beobachten war. Damit die Interferenzstreifen von der Pixelstruktur der Kamera aufgelöst werden können, muss das Sampling-Theorem [55] erfüllt sein. Λ muss daher mindestens 2 px (14,8 μm) betragen, womit sich der maximale Betrag des Einfallswinkels wie folgt berechnen lässt:

$$\beta'_{\max} = \arcsin\left(\frac{\lambda}{4 \text{ px}}\right) \quad \text{bzw.} \quad \beta_{\max} = \arcsin\left(\frac{M_{\text{IF}} \lambda}{4 \text{ px}}\right). \quad (4.1)$$

Der Versuchsaufbau eignet sich folglich, um maximale Einfallswinkel von bis zu $\beta_{\max} \approx 0,429^\circ$ nachzuweisen ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$). Wie in Kapitel 5.1.2 gezeigt wird, entspricht die mittels eines BII in der Austrittspupille (Radius R) eines Mikroskopobjektivs gemessene räumliche Kohärenzfunktion der Fouriertransformation der inkohärenten Quellverteilung im Objektraum. Daraus folgt, dass β_{\max} dem Hauptstrahlwinkel eines Objektpunkts am Rand des nutzbaren Gesichtsfeldes entspricht. Bezogen auf die Fokusebene, ergibt sich der Durchmesser des Gesichtsfeldes demnach zu:

$$D_G = \frac{2R}{\text{NA}} \beta_{\max} \quad \text{bzw.} \quad D_G \approx M_{\text{IF}} \frac{\lambda}{\text{NA}} \frac{R}{2 \text{ px}}. \quad (4.2)$$

Um den Einfluss der innerhalb des Interferometers entstehenden Aberrationen auf die Interferenzstrukturen in der Ebene des CCD-Sensors zu untersuchen, wurde zunächst $\beta = 0^\circ$ eingestellt. Hierfür wurde ein Raumfrequenzfilter verwendet, dessen Lochblende (Durchmesser $D_{\text{LB}} = 5 \mu\text{m}$) sich auf der optischen Achse des Systems befand. Die Kollimation erfolgte durch ein Mikroskopobjektiv (*Carl Zeiss Jena*, Planachromat, 2,5/0,07, $R = 4 \text{ mm}$), dessen Austrittspupille zugleich die begrenzende Apertur A des Strahlenbündels darstellte. Die Abbildungen 4.3.a)–c) zeigen drei Interferogramme bei verschiedenen Phasenlagen $\varphi = 2\pi \Delta \zeta_{\text{IF}} / \lambda$. Mithilfe eines Matlab-Skriptes, welchem der in [94] beschriebene Algorithmus zugrunde liegt, konnte daraus sowohl der Betrag $|\Gamma_{\text{Exp}}|$ als auch die Phasenfunktion ϕ_{Exp}

der experimentell bestimmten Kohärenzfunktion Γ_{Exp} berechnet werden. Da das kollimierte Laserbündel näherungsweise einer monochromatischen ebenen Welle¹³ entsprach, repräsentiert die so ermittelte Phase ϕ_{Exp} (Abbildung 4.3.d) die Differenz $\Delta\Phi_{\text{Exp}} = \Phi_2 - \Phi_1$ der in den beiden Interferometerarmen entstandenen Wellenfrontfehler $\Phi_{1,2}$. Mithilfe des verwendeten Algorithmus kann $\Delta\Phi_{\text{Exp}}$ jedoch nur auf $\text{modulo}(\lambda)$ genau berechnet werden. Um die Phasenfehler quantifizieren zu können, wurde daher ein Phasen-Unwrapping¹⁴ durchgeführt. Damit war es möglich, eine *Peak-to-Valley-Abweichung*¹⁵ (PV) von $6,20 \lambda$ bzw. eine RMSE-Abweichung von $1,17 \lambda$ zu bestimmen.

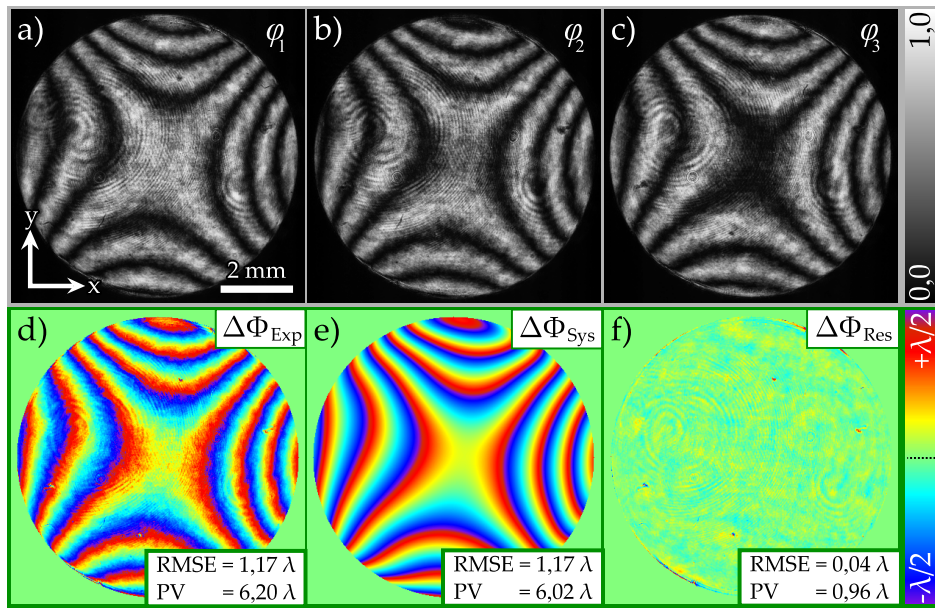


Abbildung 4.3: a)–c) Interferogramme, aus welchen die in d) dargestellte Phase $\Delta\Phi_{\text{Exp}}$ der räumlichen Kohärenzfunktion berechnet wurde. e) Durch das Unwrappen und das anschließende Entwickeln in das System der Zernike-Polynome ergibt sich daraus $\Delta\Phi_{\text{Sys}}$. f) Die Differenz aus $\Delta\Phi_{\text{Sys}}$ und $\Delta\Phi_{\text{Exp}}$ stellt die verbleibenden Restfehler $\Delta\Phi_{\text{Res}}$ dar. (Zur besseren Darstellung werden die Phasenfunktionen $\text{modulo}(\lambda)$ gezeigt.)

Aufgrund des räumlich und zeitlich kohärenten Laserlichts sind in den Interferogrammen Artefakte zu erkennen, welche durch Streuung und Reflexionen an Grenzflächen entlang des optischen Weges hervorgerufen werden. Diese Störungen zeigen sich in den Abbildungen 4.3.a)–c) besonders durch hochfrequente Ringstrukturen, welche auch im Phasenverlauf in Abbildung 4.3.d) wiederzufinden sind, jedoch keine Informationen über die durch das Interferometer verursachten Wellenfrontfehler des Systems enthalten. Um derartige Störungen herauszufiltern

¹³ Mithilfe eines Shack–Hartmann–Sensors (Thorlabs, WFS150-5C) konnte die Abweichung des einlaufenden Wellenfeldes von einer ebenen Welle vor dem Interferometer auf einen RMSE-Wert von ca. $0,02 \mu\text{m}$ bestimmt werden.

¹⁴ Hierfür wurde ein Matlab-Skript (The MathWorks, Inc., Matlab 2013a) verwendet, welches nach den von Goldstein [103] und Ghiglia [104] beschriebenen Algorithmen arbeitet.

¹⁵ Die PV-Abweichung bezeichnet Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten Messwert.

und somit die Art und Stärke der Systemfehler bestimmen zu können, wurde $\Delta\Phi_{\text{Exp}}$ bis zur zehnten radialen Ordnung in das System der Zernike-Polynome entwickelt. Die so erhaltene Phasenfunktion $\Delta\Phi_{\text{Sys}}$ ist in Abbildung 4.3.e) zu sehen. Die Differenz aus $\Delta\Phi_{\text{Sys}}$ und $\Delta\Phi_{\text{Exp}}$ entspricht den in Abbildung 4.3.f) erkennbaren Restfehlern $\Delta\Phi_{\text{Res}}$. Diese repräsentieren sowohl die durch Staubpartikel und parasitäre Reflexe hervorgerufenen Artefakte als auch Wellenfrontfehler oberhalb der zehnten Ordnung. Wie aus Abbildung 4.3.f) zu erkennen ist, sind in $\Delta\Phi_{\text{Res}}$ vor allem unregelmäßige, räumlich eng begrenzte Abweichungen von einer ebenen Phasenfunktion zu erkennen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass alle relevanten Systemfehler durch $\Delta\Phi_{\text{Sys}}$ erfasst und die Phase der Kohärenzfunktion damit von den kohärenten Störungen bereinigt wurde. Die durch das DPI verursachten Aberrationen werden vorwiegend vom Astigmatismus ($c_2^{-2} = 0,22 \lambda$, $c_2^{+2} = 1,08 \lambda$) dominiert; es sind aber auch signifikante Beiträge des Dreiblatt-Fehlers ($c_3^{-3} = -0,06 \lambda$, $c_3^{+3} = -0,09 \lambda$) und der Koma ($c_3^{+1} = -0,05 \lambda$) nachweisbar.

4.2 Numerische Korrektur der Systemfehler

Geht man davon aus, dass die Wellenfrontfehler näherungsweise unabhängig vom Einfallswinkel sind, ist es möglich, mittels der so bestimmten Systemfehler deren Einfluss auf die messbare Kohärenzfunktion Γ_{Exp} komplexerer Objektverteilungen zu reduzieren [105]:

$$\Gamma_{\text{Korr}}(\Delta\mathbf{r}) = \Gamma_{\text{Exp}}(\Delta\mathbf{r}) \cdot \exp\left(-i\frac{2\pi}{\lambda}\Delta\Phi_{\text{Sys}}(\Delta\mathbf{r})\right). \quad (4.3)$$

Für die korrigierte Phase der Kohärenzfunktion gilt somit:

$$\phi_{\text{Korr}}(\Delta\mathbf{r}) = \phi_{\text{Exp}}(\Delta\mathbf{r}) - \Delta\Phi_{\text{Sys}}(\Delta\mathbf{r}). \quad (4.4)$$

Fortan wird dieser Vorgang als Systemkorrektur bezeichnet und, falls nicht anders erwähnt, für alle in folgenden Kapiteln gezeigten Messungen durchgeführt.

Um die Abhängigkeit der Systemfehler vom Einfallswinkel zu überprüfen, wurde ϕ_{Exp} für verschiedene Werte von β bestimmt. Bei der darauffolgenden Systemkorrektur kam jedoch immer $\Delta\Phi_{\text{Sys}}$ zum Einsatz, welches bei $\beta = 0^\circ$ ermittelt wurde. Durch die Entwicklung von ϕ_{Korr} in das System der Zernike-Polynome war es möglich, die Winkelabhängigkeit einzelner Aberrationen zu quantifizieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass die Näherung einer vernachlässigbaren Abhängigkeit der Systemfehler vom Einfallswinkel beim verwendeten DPI nur in einem kleinen Bereich um die optische Achse herum gültig ist. Die Bestimmung der entsprechenden Aberrationen konnte oberhalb von $0,28^\circ$ jedoch nicht zuverlässig durchgeführt werden. Die Ursache hierfür war

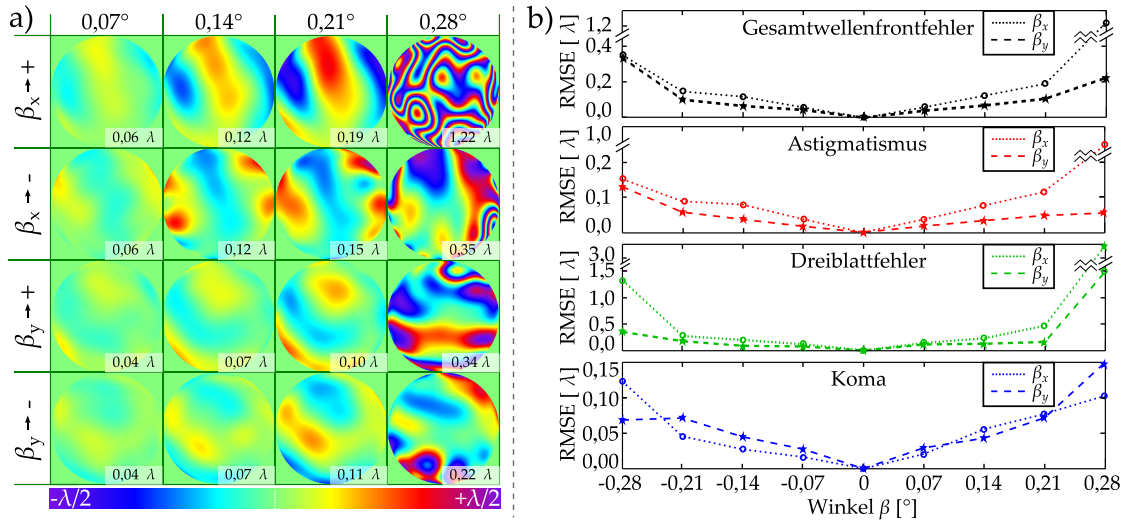


Abbildung 4.4: a) Phasen der komplexen Kohärenzfunktion nach der Systemkorrektur für verschiedene Einfallswinkel $\beta = (\beta_x, \beta_y)$. Das Vorzeichen zeigt jeweils die Richtung an, in welcher die entsprechende Winkelkomponente verändert wurde, während die andere bei 0° blieb. b) Verlauf des RMSE-Werts sowohl für den Gesamtwellenfrontfehler von ϕ_{Korr} als auch für den Astigmatismus, den Dreiblatt-Fehler und die Koma.

die Struktur der Interferenzmuster, welche aufgrund der induzierten Aberrationen zum Teil so verzerrt waren, dass der Unwrapping-Algorithmus nicht funktionierte. Somit war auch die Zernike-Entwicklung nicht mehr möglich. Abbildung 4.4.b) stellt den Verlauf des RMSE-Werts sowohl für den Gesamtphasenfehler von ϕ_{Korr} als auch für die drei stärksten Aberrationen im System der Zernike-Polynome dar. Daraus ist zu erkennen, dass die Phasenfehler mit steigendem Abstand zur optischen Achse sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung anwachsen. Den größten Beitrag zum Gesamtphasenfehler liefert hierbei der Astigmatismus (c_2^{-2}, c_2^{+2}), aber auch die Koma (c_3^{-3}, c_3^{+3}) und der Dreiblattfehler (c_3^{-1}, c_3^{+1}) zeigen eine signifikante Abhängigkeit vom eingestellten Winkelabstand.

Bei der Objektrekonstruktion auf Basis der räumlichen Kohärenzfunktion führen die winkelabhängigen Anteile der Wellenfrontfehler zu einer ortsabhängigen Deformation der Punktbildverwaschungsfunktion. Wie in Kapitel 5 gezeigt wird, entspricht die PSF eines Weitfeldbildinversionsmikroskops nicht dem klassischen Airy-Scheibchen eines konventionellen Weitfeldmikroskops. Aus diesem Grund muss hier eine von Gleichung 2.14 (Seite 10) abweichende Näherung des Strehl-Verhältnisses verwendet werden¹⁶:

$$\widetilde{SV}_{\text{IF}} \approx 1 - \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \frac{\overline{\Delta\Phi^2}}{2}. \quad (4.5)$$

¹⁶ Eine Herleitung dieses Zusammenhangs ist im Anhang B zu finden. Die genaue Definition für das Strehl-Verhältnis $\widetilde{SV}_{\text{IF}}$ im interferometrischen Fall ist in Abschnitt 5.5.1 (Seite 60) zu finden.

Mit dem Kriterium $\widetilde{SV}_{IF} \gtrsim 0,8$ für die Beugungsbegrenzung ergibt sich daraus ein maximal tolerierbarer RMSE-Wert von ca. $0,1 \lambda$. Wie aus dem Verlauf des RMSE-Werts für den Gesamtwellenfrontfehler (Abbildung 4.4) ersichtlich ist, wird dieser Wert ab einem Winkel von ca. $0,14^\circ$ erreicht. Dies bedeutet, dass mit dem verwendeten Versuchsaufbau ca. in einem Drittel des Gesichtsfeldes ($0,429^\circ$) von einer beugungsbegrenzten Rekonstruktion ausgegangen werden kann. Für quantitative Messungen wird daher in Kapitel 5 nur ein entsprechend kleiner Bereich um die optische Achse verwendet.

Es bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, um die Einschränkung des Gesichtsfeldes aufgrund ortsabhängiger Aberrationen zu überwinden. Zwar war deren Evaluierung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, dennoch sollen an dieser Stelle drei Strategien genannt werden.

Bildinversion mittels Planspiegel

Da die Winkelabhängigkeit der Aberrationen auf die Dove-Prismen zurückzuführen ist, kann diese Einschränkung durch die Wahl einer anderen Bildinversionsoptik reduziert oder gar vermieden werden. Als Beispiel wäre ein UZ-Interferometer zu nennen, bei welchem die Bildinversion ausschließlich durch Plan-Spiegel realisiert wird. In ersten Versuchen mit einem solchen Interferometer konnten keine Winkelabhängigkeiten und nur vernachlässigbare Systemfehler beobachtet werden [106].

Ortsabhängige Aberrationskorrektur

Durch die Messung der Aberrationen für verschiedene Einfallswinkel kann eine winkelabhängige numerische Aberrationskorrektur durchgeführt werden. Denkbar wäre beispielsweise eine Entfaltung verschiedener Bildbereiche durch unterschiedlich aberrierte Punktbildverwaschungsfunktionen.

Bildoptimierungsalgorithmen

Durch den von Wagadarikar [107] verwendeten iterativen Algorithmus oder ähnliche Ansätze können winkel- beziehungsweise ortsabhängige Wellenfrontfehler kompensiert werden. Ohne genauere Untersuchungen kann jedoch an dieser Stelle nicht abgeschätzt werden, bis zu welcher Stärke der entsprechenden Aberrationen derartige Ansätze funktionieren oder wie zuverlässig sie zum korrekten Ergebnis konvergieren. Zudem ist unklar, inwieweit die Komplexität der Szene und somit der Kohärenzfunktion einen Einfluss auf die Zuverlässigkeit und die Geschwindigkeit solcher Algorithmen hat.

5 Weitfeldbildinversionsmikroskopie

Wie in Kapitel 3 erläutert wurde, ist es möglich, die komplexwertige räumliche Kohärenzfunktion mithilfe interferometrischer Verfahren zu bestimmen. Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass der Einsatz eines bildinvertierenden Interferometers zu einem maximalen Korrelationsabstand innerhalb eines begrenzten Wellenfeldes führt. Anschließend wurde in Kapitel 4 der Laboraufbau eines solchen BII auf Basis von Dove-Prismen vorgestellt und die damit verbundenen Systemfehler charakterisiert.

Im Folgenden wird der Einsatz des BII zur Bildgebung in der optischen Weitfeldmikroskopie demonstriert. Zu Beginn dieses Kapitels werden hierfür einige grundlegende Betrachtungen zum Funktionsprinzip durchgeführt, wobei zunächst von 2D-Strukturen ausgegangen wird. Im Anschluss daran wird der Laboraufbau vorgestellt, mit welchem die Abbildungseigenschaften eines solchen bildinvertierenden Weitfeldmikroskops charakterisiert wurden. Die entsprechenden Ergebnisse werden stets mit denen eines herkömmlichen Weitfeldmikroskops verglichen. Neben der Vermessung der Punktbildverwaschungsfunktion und der Bestimmung des Auflösungsvermögens wird vor allem die Schärfentiefe des interferometrischen Systems und dessen Abbildungseigenschaften in Bezug auf 3D-Strukturen untersucht. Hierbei wird auch auf den Unterschied zwischen ento- und telezentrischen Systemen eingegangen. Zudem werden die Möglichkeiten zur numerischen Aberrationskorrektur sowie der spektral aufgelösten Rekonstruktion mikroskopischer Objekte diskutiert und experimentell verifiziert.

5.1 Abbildungseigenschaften eines Weitfeldbildinversionsmikroskops

5.1.1 Vorbetrachtung

Wie bereits in der Einführung erwähnt, basiert das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren auf dem Van-Cittert-Zernike-Theorem. Es beschreibt den Zusammenhang zwischen der Intensität einer räumlich inkohärenten Quellverteilung und der räumlichen Kohärenzfunktion zwischen zwei Punkten innerhalb des davon ausgehenden Wellenfeldes (Kapitel 2.3.3, Seite 15). Das Theorem besagt unter anderem, dass Γ im Fernfeld dem Fourierspektrum der Intensitätsverteilung der Quellstruktur entspricht. In diesem Fall ist die Objektrekonstruktion folglich mithilfe einer inversen Fouriertransformation der räumlichen Kohärenzfunktion möglich. Ein linsenloser Ansatz, wie er im Rahmen des *coherence imaging* von diversen Autoren (z.B. [26, 35, 108]) verwendet wird, eignet sich für die hochauflösende Mi-

kroskopie jedoch nicht. Zwar ist die Fraunhofer-Näherung für kleine Objekte schon nach einigen Zentimetern erfüllt¹⁷, beim Einsatz herkömmlicher CCD- oder CMOS-Sensoren kann dann jedoch nur ein kleiner Aperturwinkel und somit ein niedriges Auflösungsvermögen erreicht werden¹⁸.

Um größeren Aperturwinkel und damit auch höhere Auflösungsvermögen zu erzielen, bietet sich die Verwendung einer Sammellinse oder eines Mikroskopobjektivs (MO) an [43]. Im Rahmen der paraxialen Näherung¹⁹ entspricht die Feldverteilung in der hinteren Brennebene der Linse der Fouriertransformation der Amplitudenverteilung in deren vorderer Brennebene [55]. Die Fernfeldverteilung der räumlichen Kohärenzfunktion kann demnach mithilfe eines bildinvertierenden Interferometers in der hinteren Brennebene der Linse bestimmt werden.

Im Rahmen des *coherence imaging* wird ein solcher Grundaufbau beispielsweise von Naik et al. [41, 110] und in abgewandelter Form von Potluri et al. [42] verwendet. Das Problem dieses Ansatzes besteht darin, dass die begrenzte Ausdehnung der Linse bzw. eines Mikroskopobjektivs nicht berücksichtigt wird. Abbildung 5.1 soll den Sachverhalt am Beispiel einer punktförmigen Lichtquelle und einer dünnen Linse verdeutlichen. Da in dieser Arbeit besonders die Eigenschaft der erweiterten Schärfentiefe diskutiert werden soll, wird in Abbildung 5.1 bereits berücksichtigt, dass die Punktlichtquelle einen Abstand Δz zur Brennebene des Mikroskopobjektivs besitzen kann.

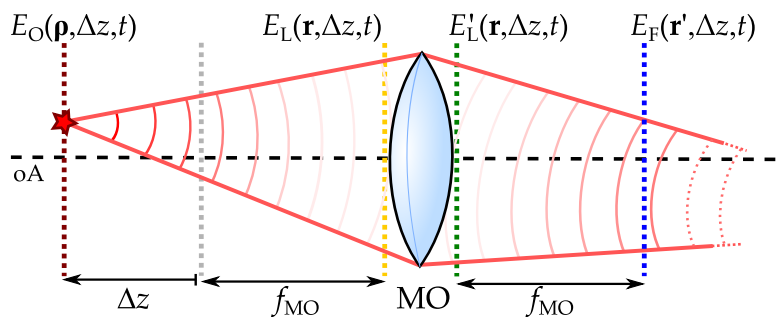


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Lichtausbreitung vom Objektraum in die hintere Brennebene einer dünnen Linse. Aufgrund des lateralen Abstandes der Punktlichtquelle zur optischen Achse ist die Feldverteilung in der hinteren Brennebene nicht symmetrisch zur optischen Achse.

Befindet sich der Lichtpunkt nicht auf der optischen Achse, besitzt die komplexe Amplitudenverteilung E'_L direkt hinter der Linse einen linearen Phasenanteil.

¹⁷ Für ein Objekt mit einem Durchmesser $D_{\text{Obj}} = 200 \mu\text{m}$ ist der Fraunhofer-Fall bei einer Wellenlänge $\lambda = 550 \text{ nm}$ beispielsweise erreicht, wenn der Abstand z zwischen Objekt und Korrelationsebene sehr viel größer als $2D_{\text{Obj}}^2/\lambda = 14,6 \text{ cm}$ ist.

¹⁸ Mit einem CCD-Chip im Kleinbildformat ($24 \text{ mm} \times 36 \text{ mm}$) ergibt sich bereits für $z = 14,6 \text{ cm}$ ein Aperturwinkel α von ca. $4,7^\circ$. Dies entspricht einer numerischen Apertur $NA \approx 0,08$. Bezogen auf das Rayleigh-Kriterium eines WIMs (Gleichung 5.15, Seite 44) ist damit jedoch nur ein laterales Auflösungsvermögen von ca. $2,9 \mu\text{m}$ möglich ($\lambda = 550 \text{ nm}$).

¹⁹ In der Regel wird die paraxiale Näherung bis zu einer numerischen Apertur von ca. 0,6 als hinreichend genau angesehen [109].

Dieser kodiert die laterale Position der Punktlichtquelle. In Kombination mit der Begrenzung des Wellenfeldes durch den Rand der Linse führt dieser Phasenverlauf dazu, dass die Feldverteilung E_F in der hinteren Brennebene nicht mehr um die optische Achse zentriert ist. Wird diese Amplitudenverteilung nun durch ein BII hindurch abgebildet, überlagern sich die beiden zueinander räumlich invertierten Wellenfelder E_1 und E_2 nicht mehr vollständig. Wie in Abbildung 5.1 angedeutet, verkleinert sich die Ausdehnung von E_1 und E_2 mit wachsendem Abstand der Punktlichtquelle zur Linse. Dies reduziert den Überlappungsbereich zusätzlich²⁰. Die Begrenzung des Überlappungsbereichs entspricht einer Verkleinerung des Korrelationsbereichs, woraus eine Verringerung des maximal erreichbaren Korrelationsabstandes resultiert (Abbildung 5.2.a). Dies ist, wie in Kapitel 3.1.4 (Seite 20) erläutert, mit einer Einschränkung des Ortsfrequenzspektrums verbunden und führt folglich zu einer Verschlechterung des Auflösungsvermögens.

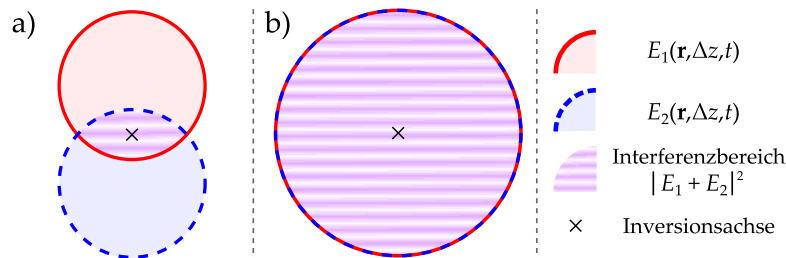


Abbildung 5.2: Überlagerung der Amplitudenverteilungen E_1 und E_2 am Ausgang des BII für den in Abbildung 5.1 gezeigten Fall. In a) wird hierfür E_F durch das BII hindurch abgebildet, während für b) das Wellenfeld in der Ausgangspupille E'_L gewählt wurde.

Wird statt der hinteren Brennebene die Austrittspupille der Linse durch das BII hindurch auf die CCD-Kamera abgebildet, kann eine vollständige Überlagerung von E_1 und E_2 erreicht werden (Abbildung 5.2.b). Der Überlappungsbereich ist dann unabhängig von der lateralen und axialen Position des Quellpunkts. Dieser entscheidende Vorteil des in Abbildung 5.3 dargestellten Ansatzes wurde bereits umfassend diskutiert und konnte auch experimentell verifiziert werden [43].

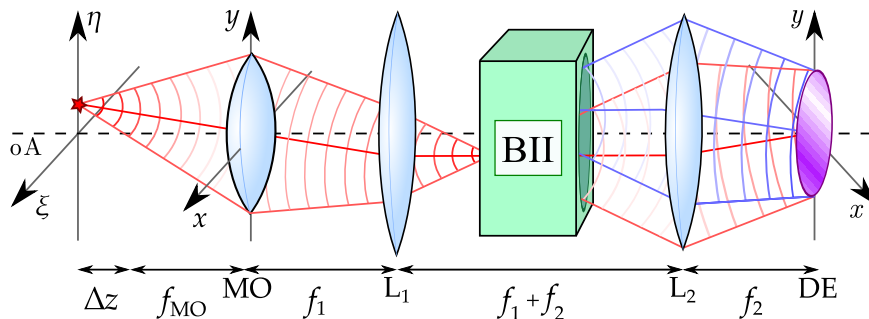


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung eines Weitfeldbildinversionsmikroskops. Das Mikroskopobjektiv wird in dieser Skizze durch eine dünne Linse repräsentiert.

²⁰ Im Grenzfall $\Delta z \rightarrow +\infty$ können zwei voneinander getrennte Airy-Scheibchen mit gegebenenfalls verschwindendem Überlappungsbereich beobachtet werden.

Bei den in den Abbildungen 5.1 und 5.3 gezeigten Aufbauten ist das Mikroskopobjektiv ausschließlich als dünne Linse eingezeichnet. In diesem Fall entspricht die Austrittspupille dem Linsenrand, was zu entozentrischen Abbildungen führt (Kapitel 2.1.2, Seite 4). Gerade bei großen Schärfentiefen, wie sie mit dem hier untersuchten Verfahren möglich sind, kann die daraus resultierende perspektivische Verzerrung problematisch sein. Bei vielen modernen Mikroskopobjektiven befindet sich die Austrittspupille jedoch in deren hinterer Brennebene. Wie im Folgenden unter anderem gezeigt wird, führt dies auch im Weitfeldbildinversionsmikroskop zu einer telezentrischen Projektion der Objektstruktur. Mit wachsender Objektweite kann es bei diesen Mikroskopobjektiven jedoch zu einer reduzierten Ausleuchtung der Austrittspupille kommen, was in einer Begrenzung der erreichbaren Schärfentiefe des WIIMs resultiert (Abschnitt 5.5.2, Seite 62).

5.1.2 Theoretische Behandlung

Es bieten sich zwei Ansätze an, um den Zusammenhang zwischen dem Ortsfrequenzspektrum \mathcal{G} einer räumlich inkohärenten Objektverteilung I_O und der räumlichen Kohärenzfunktion Γ_{AP} in der Austrittspupille eines Mikroskopobjektivs herzuleiten. Die erste Möglichkeit besteht darin, die Ausbreitung der Amplitudenverteilung vom Objekt in die Austrittspupille des Mikroskopobjektivs zu beschreiben und daraus anschließend die Kohärenzfunktion zu berechnen [43]. Die räumliche Inkohärenz der Objektstruktur kann hierbei durch die Einführung einer räumlich und zeitlich statistisch variierenden Phasenfunktion $\Omega(\rho, t)$ berücksichtigt werden [55]. Die Amplitudenverteilung in der Objektebene ergibt sich dann zu $E_O(\rho, t) = \sqrt{I_O(\rho)} \exp(i\Omega(\rho, t))$. Die zweite Möglichkeit besteht darin, die Propagation der Kohärenzfunktion zu untersuchen. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, die Kohärenzeigenschaften der Beleuchtungsfunktion auf einfache Art und Weise berücksichtigen zu können (siehe dazu auch Anhang C). Dies ist dann notwendig, wenn nicht-selbstleuchtende Strukturen untersucht werden, deren Beleuchtung räumlich partiell-kohärent ist. Für die folgenden Betrachtungen wird jedoch vorausgesetzt, dass das Wellenfeld in der Objektebene vollständig räumlich inkohärent ist. Zudem wird zunächst angenommen, dass alle Objektpunkte in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse liegen. Auf die Erweiterung zu einer dreidimensional ausgedehnten Objektverteilung wird später in Abschnitt 5.6 eingegangen.

Unter dieser Bedingung kann die räumliche Kohärenzfunktion $\Gamma_O(\rho_1, \rho_2)$ mathematisch durch das Produkt der Intensitätsverteilung $I_O(\rho_1)$ und der Delta-Distribution $\delta(\rho_1 - \rho_2)$ beschrieben werden [29]:

$$\Gamma_O(\rho_1, \rho_2) = \kappa I_O(\rho_1) \delta(\rho_1 - \rho_2). \quad (5.1)$$

Bei κ handelt es sich um die bereits in Kapitel 2.3.3 (Seite 15) eingeführte Konstante λ^2/π . Nach der Propagation um eine Strecke z durch den Freiraum²¹ ergibt sich die räumliche Kohärenzfunktion in der Eintrittspupille des Mikroskopobjektivs zu:

$$\Gamma_{\text{EP}}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, z) = \frac{\exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_2^2 - \mathbf{r}_1^2]\right)}{(\lambda z)^2} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \Gamma_{\text{O}}(\boldsymbol{\rho}_1, \boldsymbol{\rho}_2) \exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda z} [\boldsymbol{\rho}_2^2 - \boldsymbol{\rho}_1^2]\right) \times \exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_2 \boldsymbol{\rho}_2 - \mathbf{r}_1 \boldsymbol{\rho}_1]\right) d\boldsymbol{\rho}_1 d\boldsymbol{\rho}_2. \quad (5.2)$$

Unter Verwendung einer runden Apertur, kann die endliche Größe der EP durch die Pupillenfunktion $\mathcal{P}(\mathbf{r}/R) = \text{circ}(\mathbf{r}/R)$ mit dem Radius R berücksichtigt werden. Hierbei ist die Kreisscheibenfunktion $\text{circ}(\mathbf{r}/R)$ wie folgt definiert [55]:

$$\text{circ}(\mathbf{r}/R) = \begin{cases} 1 & \text{für } |\mathbf{r}/R| < 1 \\ 1/2 & \text{für } |\mathbf{r}/R| = 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}. \quad (5.3)$$

Im Rahmen dieser Herleitung sollen die grundlegenden mathematischen Zusammenhänge am Beispiel einer einfachen, dünnen Linse aufgezeigt werden. Deren Einfluss auf die Phase des einfallenden Wellenfeldes wird im aberrationsfreien Fall durch $\exp\left(i\frac{\pi}{\lambda f} \mathbf{r}^2\right)$ beschrieben. Ohne zusätzliche Aperturblende ist die Begrenzung der Linse sowohl die Eintritts- als auch die Austrittspupille²². Die räumliche Kohärenzfunktion in der Austrittspupille ist demnach:

$$\Gamma_{\text{AP}}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, z) = \frac{\exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_2^2 - \mathbf{r}_1^2]\right)}{(\lambda z)^2} \mathcal{P}\left(\frac{\mathbf{r}_1}{R}\right) \mathcal{P}^*\left(\frac{\mathbf{r}_2}{R}\right) \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda f} [\mathbf{r}_2^2 - \mathbf{r}_1^2]\right) \times \iiint_{-\infty}^{+\infty} \Gamma_{\text{O}}(\boldsymbol{\rho}_1, \boldsymbol{\rho}_2) \exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda z} [\boldsymbol{\rho}_2^2 - \boldsymbol{\rho}_1^2]\right) \times \exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_2 \boldsymbol{\rho}_2 - \mathbf{r}_1 \boldsymbol{\rho}_1]\right) d\boldsymbol{\rho}_1 d\boldsymbol{\rho}_2. \quad (5.4)$$

Wird $\Gamma_{\text{AP}}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, z)$ mithilfe eines BII gemessen, gilt $\mathbf{r}_2 = -\mathbf{r}_1$, wobei sich der Differenzvektor zu $\Delta\mathbf{r} = 2\mathbf{r}_1$ ergibt. Dies hat zur Folge, dass sich die beiden Exponentialfunktionen außerhalb des Integrals in Gleichung 5.4 zu 1 kürzen. Das Produkt der Pupillenfunktionen lässt sich dann als $|\mathcal{P}(\mathbf{r}_1/R)|^2 = \mathcal{P}(\Delta\mathbf{r}/2R)$ darstellen [43]. Aufgrund der räumlichen Inkohärenz (Gleichung 5.1) kann die Integration über

²¹ Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird davon ausgegangen, dass das Medium im Objektraum eine Brechzahl $n = 1$ besitzt.

²² Ist dies nicht der Fall, kann mithilfe des Pupillenabbildungsmaßstabes eine Koordinatentransformation zwischen Ein- und Austrittspupille durchgeführt werden [51].

$d\rho_2$ ausgeführt werden und Γ_{AP} lässt sich als Funktion von $\Delta\mathbf{r}$ schreiben:

$$\Gamma_{AP}(\Delta\mathbf{r}, z) = \frac{\kappa}{(\lambda z)^2} \mathcal{P}\left(\frac{\Delta\mathbf{r}}{2R}\right) \iint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\rho_1) \exp\left(-i\frac{2\pi}{\lambda z} [\Delta\mathbf{r} \rho_1]\right) d\rho_1. \quad (5.5)$$

Bis auf einen multiplikativen Faktor entspricht die in der Austrittspupille des MOs mithilfe eines BII gemessene komplexe räumliche Kohärenzfunktion somit dem Fourierpektrum der Objektstruktur I_O , welches durch die Pupillenfunktion begrenzt wird. Es bietet sich daher an, den in der Austrittspupille bestimmten Differenzvektor $\Delta\mathbf{r} = (2y, 2x)$ mit den Ortsfrequenzen $\mathbf{v} = (v_x, v_y)$ zu assoziieren [43]:

$$\mathbf{v} = \frac{\Delta\mathbf{r}}{\lambda z} = \frac{2}{\lambda z} \begin{pmatrix} y \\ x \end{pmatrix}. \quad (5.6)$$

Durch das Einsetzen von Gleichung 5.6 in die Pupillenfunktion $\mathcal{P}(\Delta\mathbf{r}/2R)$ ergibt sich die Grenzfrequenz des optischen Systems:

$$v_{\max} = \frac{|\Delta\mathbf{r}_{\max}|}{\lambda z} = \frac{2R}{\lambda z}. \quad (5.7)$$

Im Rahmen der paraxialen Näherung kann v_{\max} in der Nähe der Fokusebene durch die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs ausgedrückt werden:

$$v_{\max} \approx \frac{2NA}{\lambda}. \quad (5.8)$$

Die Grenzfrequenz des Weitfeldbildinversionsmikroskops ist demnach identisch mit der Grenzfrequenz eines konventionellen Weitfeldmikroskops unter identischen Voraussetzungen. An dieser Stelle sei noch einmal auf den Vorteil des vorgestellten Systems gegenüber einem Mikroskop auf Basis eines RadSI hingewiesen. Nach Gleichung 3.5 (Seite 21) und Gleichung 5.7 würde sich dessen Grenzfrequenz zu

$$v_{\text{RadSI}, \max} = \left(1 - \frac{1}{M_{\text{RadSI}}^2}\right) \frac{NA}{\lambda} \quad (5.9)$$

ergeben. Im Grenzfall $M_{\text{RadSI}} \rightarrow \infty$ wäre die so maximal übertragbare Ortsfrequenz demnach nur halb so groß wie unter Verwendung eines BII.

Nach den Gleichungen 5.5 – 5.7 entspricht die Struktur der in der Austrittspupille gemessenen räumlichen Kohärenzfunktion dem Ortsfrequenzspektrum:

$$\mathcal{G}(\mathbf{v}, z) = \frac{\kappa}{(\lambda z)^2} \mathcal{P}\left(\frac{\mathbf{v}}{v_{\max}}\right) \iint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\rho) \exp(-2\pi i \mathbf{v} \rho) d\rho. \quad (5.10)$$

Durch Anwendung der inversen Fouriertransformation kann hieraus die Objektstruktur I_R rekonstruiert werden. Da die Pupillenfunktion \mathcal{P} das Ortsfrequenz-

spektrum beschränkt und somit als *interferometrische optische Übertragungsfunktion* (Interferometric Optical Transfer Function, IOTF) interpretiert werden kann, entspricht deren Fouriertransformation der *interferometrischen Punktbildverwaschungsfunktion* IPSF. Im hier diskutierten Fall handelt es sich dabei um eine sogenannte Bessel-Sinc-Funktion. Diese ist durch die Bessel-Funktion erster Ordnung J_1 definiert, welche durch ihr Argument geteilt wird. Die Objektrekonstruktion ergibt sich dann aus der Faltung der IPSF mit der durch $M(z)$ skalierten Objektstruktur I_O :

$$I_R(\mathbf{s}, z) = \frac{\kappa}{(\lambda z)^2} \left[\text{IPSF}(\mathbf{s}) \otimes I_O \left(\frac{\mathbf{s}}{M(z)} \right) \right] \quad (5.11)$$

$$\text{IPSF}(\mathbf{s}) = 2 \frac{J_1(2q\mathbf{s})}{2q\mathbf{s}}. \quad (5.12)$$

Hierbei entspricht $\mathbf{s} = (s_x, s_y)$ den lateralen Koordinaten im interferometrisch rekonstruierten Bild. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in Gleichung 5.12 $q = \frac{2\pi}{\lambda} \text{NA}$ eingeführt. Der Vorfaktor $(\lambda z)^{-2}$ berücksichtigt die Energieerhaltung im Abbildungssystem und bleibt durch die inverse Fouriertransformation unverändert. Da die IPSF keine Funktion von z ist, wird I_O unabhängig von der axialen Position der Struktur im Raum beugungsbegrenzt wiedergegeben. Dies ist gleichbedeutend mit einer unbegrenzten Schärfentiefe. Da die Ortsfrequenzen nach Gleichung 5.6 jedoch durch z definiert sind, ergibt sich ein tiefenabhängiger Abbildungsmaßstab $M(z)$. Wie in Abschnitt 5.6.1 gezeigt wird, beträgt dieser im hier betrachteten Fall einer dünnen Linse $M(z) = z/z_0$, wobei z_0 der Abstand zwischen der Fokusebene und der Eintrittspupille ist.

Wird ein telezentrisches Mikroskopobjektiv verwendet, befindet sich die Aperturblende in dessen hinterer Brennebene. Nach Gleichung 5.13 ist \mathbf{v} dann nicht durch z , sondern durch die Brennweite des Objektivs f_{MO} definiert²³, wodurch der Abbildungsmaßstab tiefenunabhängig wird.

$$\mathbf{v} = \frac{\Delta \mathbf{r}}{\lambda f_{\text{MO}}} \quad (5.13)$$

Der Vorfaktor $\kappa/(\lambda z)^2$ in Gleichung 5.10 verändert sich im telezentrischen Grenzfall ebenfalls und muss durch $\kappa/(\lambda f_{\text{MO}})^2$ ersetzt werden. Es kommt demnach auch nicht zu einer tiefenabhängigen Skalierung der Intensität der Objektstruktur. Die Ursache hierfür ist der Aperturwinkel, welcher sich, wie in Abschnitt 2.1.2 (Seite 4) erwähnt, nicht mit der Objektweite verändert. Die durch das Mikroskopobjektiv aufgenommene Strahlungsleistung ist demnach unabhängig von der axialen Position eines Objektpunkts. Da der Aperturwinkel durch die Aperturblende bestimmt

²³ Dieses Ergebnis wird gewonnen, wenn die Propagation der Kohärenzfunktion bis in die hintere Brennebene des Mikroskopobjektivs durchgeführt wird. Die Pupillenfunktion entspricht dann der dort befindlichen Aperturblende. Die detaillierte Herleitung findet sich in Anhang A.

wird, bedeutet dies, dass die Intensität innerhalb der Aperturblende ebenfalls unabhängig von der axialen Position des Quellpunkts ist (Anhang A).

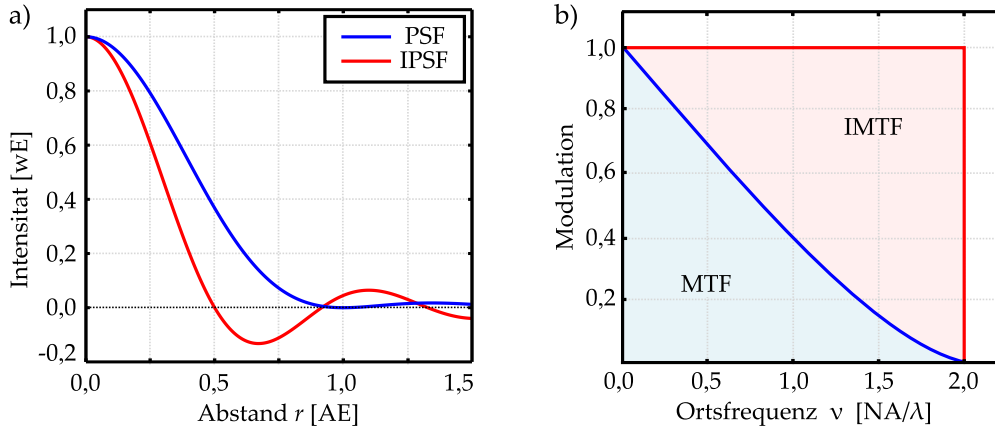


Abbildung 5.4: a) Vergleich der klassischen PSF mit der IPSF, jeweils normiert auf einen maximalen Wert von 1. Der Abstand ist auf den Durchmesser des Airy-Scheibchens (Airy-Einheit, AE) normiert. b) Während die MTF des konventionellen Systems mit zunehmender Ortsfrequenz abfällt, bleibt die interferometrische MTF (IMTF) bis zur Grenzfrequenz konstant.

Abbildung 5.4.a) stellt die IPSF und die Punktbildverwaschungsfunktion des konventionellen Weitfeldmikroskops (Airy-Scheibchen) im direkten Vergleich dar. Der Abstand der beiden ersten Nullstellen δr_N verringert sich bei der IPSF gegenüber der PSF um 50 % und die Halbwertbreite (HWB) δr_{HWB} sinkt um ca. 32 % [46]. Nach dem Rayleigh-Kriterium werden zwei Punkte als gerade noch auflösbar angesehen, wenn sich das Intensitätsmaximum des einen Punktbildes im ersten Minimum des anderen befindet. Dabei kommt es zwischen den Punktbildern zu einem Intensitätsabfall auf ca. 74 % der Maximalintensität. Eine vergleichbare Intensitätsverteilung erhält man im interferometrischen Fall, wenn die Quellpunkte einen Abstand δr_R vom ca. 1,05-Fachen des Abstands der ersten Minima besitzen [79]. Der Auflösungsgewinn entspricht dann ca. 30 %. Dies führt zu einer gesteigerten Zweipunktauflösung und einer verbesserten Kontrastwiedergabe. Die entsprechenden Größen sind in den folgenden Gleichungen zusammengefasst:

$$\delta r_N = 0,305 \frac{\lambda}{\text{NA}} \quad (5.14) \quad \delta r_R = 0,43 \frac{\lambda}{\text{NA}} \quad (5.15)$$

$$\delta r_{\text{HWB}} = 0,353 \frac{\lambda}{\text{NA}}. \quad (5.16)$$

Abbildung 5.4.b) zeigt den Betrag der *optischen Übertragungsfunktion* (Optical Transfer Function, OTF), die *Modulationsübertragungsfunktion* (MTF), sowohl für die klassische Abbildung als auch für das vorgestellte interferometrische Verfahren. Die konventionelle MTF ist durch die Autokorrelationsfunktion der Pupillenfunktion $\mathcal{P}(2\nu/\nu_{\text{max}})$ [56] gegeben. Sie fällt daher mit steigender Ortsfrequenz bis zu ν_{max}

auf 0 ab, wodurch feine Strukturdetails mit einem schwächeren Kontrast als im WIIM wiedergegeben werden. Die IMTF hingegen entspricht der Pupillenfunktion \mathcal{P} und ist somit konstant 1, bis sie bei ν_{\max} auf 0 abfällt. Dies bedeutet, dass das WIIM alle Ortsfrequenzen bis hin zur Grenzfrequenz ungedämpft überträgt.

5.2 Versuchsaufbau

Nachdem das bildinvertierende Interferometer in Kapitel 4 bereits besprochen und das Funktionsprinzip im vorangegangenen Abschnitt erläutert wurde, soll nun zunächst der vollständige Laboraufbau des Weitfeldbildinversionsmikroskops vorgestellt werden. Bei dem in Abbildung 5.5 schematisch dargestellten Aufbau handelt es sich um eine Kombination aus einem klassischen Durchlichtmikroskop²⁴ und dem bildinvertierenden Interferometer. Zur Ausleuchtung der Objektebene (OE)

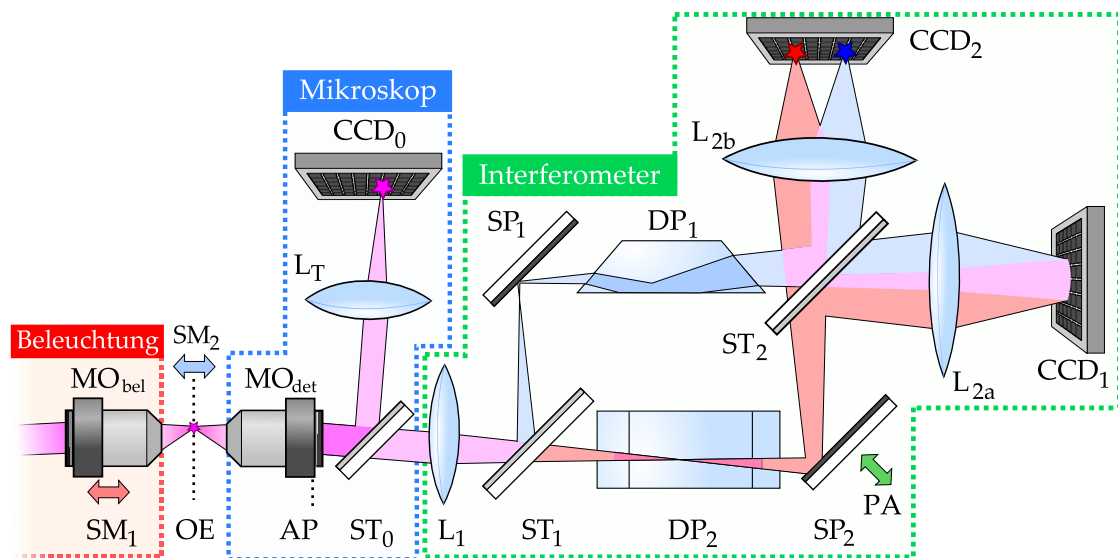


Abbildung 5.5: Laboraufbau des Weitfeldbildinversionsmikroskops. (AP – Austrittspupille, CCD – CCD-Kamera, DP – Dove-Prisma, L – Linse, MO – Mikroskopobjektiv, OE – Objektebene, PA – Piezo-Aktuator, SP – Spiegel, SM – Schrittmotor, ST – Strahlteiler)

kamen verschiedene Konzepte zum Einsatz, welche im Folgenden jeweils gesondert erläutert werden. Im rot markierten Beleuchtungsteil ist daher nur das Beleuchtungsmikroskopobjektiv MO_{bel} sowie der Schrittmotor SM_1 (Luigs & Neumann GmbH, SM1) eingezeichnet. Durch diesen Schrittmotor konnte die Beleuchtungseinheit relativ zur Objektebene bewegt werden. Mithilfe des zweiten Schrittmotors SM_2 (Luigs & Neumann GmbH, SM1) war es möglich, das Testobjekt innerhalb des Objektraums in axialer Richtung zu verschieben. Dies erlaubte sowohl eine sehr genaue Justierung als auch die automatisierte Aufnahme von 3D-Bilderstapeln. Der in Abbildung 5.5 blau markierte Beobachtungsteil des Durchlichtmikroskops

²⁴ Hierbei handelt es sich um einen selbst konzipierten Laboraufbau.

bestand aus dem Beobachtungsmikroskopobjektiv MO_{det} und der Tubuslinse L_T (Brennweite $f_T = 165 \text{ mm}$). Die Aufnahme der konventionellen Vergleichsmessungen erfolgte mittels der Kamera CCD_0 (*Allied Vision Technologies GmbH*, Guppy PRO F-503). Im Rahmen dieser Arbeit kamen vier Mikroskopobjektive zum Einsatz, deren technische Parameter in Tabelle 5.1 zusammengefasst sind.

Tabelle 5.1: Technische Parameter der verwendeten Mikroskopobjektive.

Hersteller	Typ	Daten	Abkürzung
Carl Zeiss Jena	Planachromat	2,5x / 0,07 160 mm / -	ZP007
Carl Zeiss Jena	Planachromat	20x / 0,40 ∞ / -	ZP040
Carl Zeiss	EC Epiplan	20x / 0,40 ∞ / -	ZE040
Leica	HC PL Fluotar	50x / 0,80 ∞ / -	LF080

Der Strahlteiler ST_0 konnte aus dem Strahlengang entfernt werden, um das Mikroskop vom klassischen Betrieb in den interferometrischen zu versetzen. Das in Kapitel 4 bereits ausführlich erläuterte BII ist in Abbildung 5.5 grün markiert. Die Austrittspupille AP des MO_{det} wurde mithilfe der Objektive L_1 und L_{2a} durch das BII hindurch auf die Kamera CCD_1 abgebildet. Diese befand sich in deren hinterer Brennebene von L_{2a} . Am zweiten Ausgang des Interferometers wurde die Objektebene durch das Objektiv L_{2b} auf die Kamera CCD_2 abgebildet. Wie bereits erwähnt, diente dieser Ausgang hauptsächlich zur Kalibrierung und Justage des Mikroskops. Sowohl bei CCD_1 als auch bei CCD_2 handelte es sich um das Kameramodell Pike F-032B der Firma Allied Vision Technologies GmbH. Zur Aufnahme der Messwerte wurden die Kameras stets im 14-bit-Modus betrieben. Die Beleuchtungsintensität wurde so gewählt, dass Belichtungszeiten von ca. 20 ms bis 500 ms eingestellt werden konnten, um den vollständigen Tonwertumfang zu nutzen.

5.3 Abbildung zweidimensionaler Objekte

Die Struktur der Punktbildverwaschungsfunktion eines WIIM unterscheidet sich sowohl in lateraler als auch in axialer Richtung grundlegend von der eines konventionellen Weitfeldmikroskops. Wie bereits im Abschnitt 5.1.2 gezeigt wurde, ist die IPSF lateral betrachtet schmaler als das Airy-Scheibchen, während die axiale

Ausdehnung im Rahmen der paraxialen Näherung unendlich ist. Es ist demnach sinnvoll, auf beide Aspekte getrennt voneinander einzugehen. Im Folgenden wird daher zuerst die Abbildung dünner Strukturen²⁵ untersucht und mit den entsprechenden Aufnahmen eines konventionellen Mikroskops verglichen. Hierbei wird vor allem auf die Form des Punktbildes und das daraus resultierende laterale Auflösungsvermögen eingegangen. Als Beobachtungsmikroskopobjektiv kam hierfür das ZP007 (2,5x, 0,07) zum Einsatz.

5.3.1 Laterale Punktbildverwaschungsfunktion

Da für die Vermessung der IPSF keine geeigneten punktförmigen Objekte zur Verfügung standen, wurde ein kollimiertes HeNe-Laserbündel ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) mithilfe des MO_{bel} (ZP040) in die Objektebene des MO_{det} (ZP007) fokussiert. Die Beleuchtungsapertur war mit $\text{NA}_{\text{bel}} = 0,40$ deutlich größer als die Beobachtungsapertur mit $\text{NA}_{\text{det}} = 0,07$, weswegen das Beugungsbild in guter Näherung als punktförmig betrachtet werden konnte. Abbildung 5.6.a) zeigt das Airy-Scheibchen, welches mittels der Tubuslinse L_T auf der CCD_0 aufgenommen wurde. Die Halbwertsbreite dieses Punktbildes beträgt $\delta r_{\text{HWB}} = (4,65 \pm 0,03) \mu\text{m}$ und der Abstand der ersten Nullstellen zueinander δr_N ist $(10,81 \pm 0,18) \mu\text{m}$. Mit theoretischen Werten von $\delta r_{\text{HWB,th}} = 4,66 \mu\text{m}$ bzw. $\delta r_{N,\text{th}} = 11,03 \mu\text{m}$ liegen die Abweichungen zur Messung unter 2 %. Es kann daher von einer nahezu beugungsbegrenzten Abbildung ausgegangen werden.

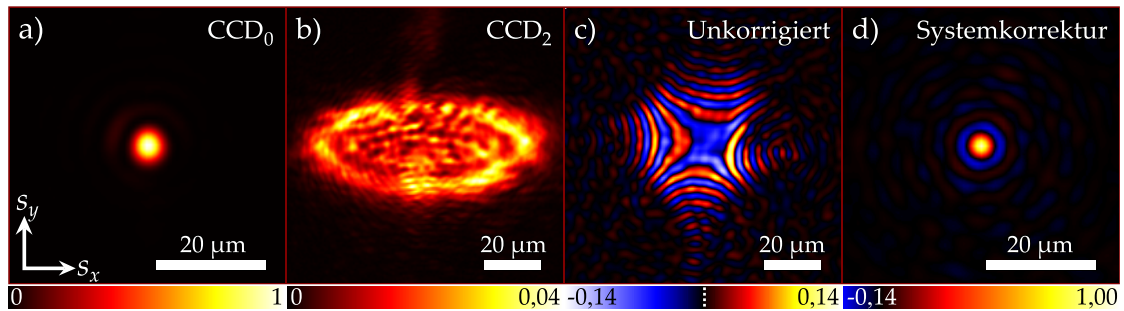


Abbildung 5.6: Vergleich der Punktbilder für die klassische Abbildung auf Kamera CCD_0 (a), die klassische Abbildung durch das DPI hindurch auf Kamera CCD_2 (b), die unkorrigierte Rekonstruktion auf Basis der komplexen Kohärenzfunktion (c) und die interferometrische Rekonstruktion nach der Systemkorrektur (d).

In Abbildung 5.6.b) ist das Punktbild dargestellt, welches hinter dem Interferometer auf der CCD_2 ²⁶ aufgenommen werden konnte. Hierfür wurde das Licht in einem Arm des BII blockiert. Die durch das Dove-Prisma induzierten Aberrationen führten zu einer starken Verzerrung und Verbreiterung des Punktbildes. Die Re-

²⁵ Unter dünnen Strukturen sind Objekte zu verstehen, deren axiale Ausdehnung nicht größer ist als die der klassischen PSF.

²⁶ Der Abstand zwischen L_{2b} und CCD_2 wurde so gewählt, dass die Fläche des Punktbildes minimal war.

konstruktion des Lichtpunkts mithilfe der gemessenen räumlichen Kohärenzfunktion, allerdings ohne Systemkorrektur (Kapitel 4.2, Seite 33), ist in Abbildung 5.6.c) zu sehen. Zur Messung von Γ wurden hier, wie bereits in Abschnitt 4.1 (Seite 30) beschrieben, drei Interferogramme verwendet. Aufgrund der unterschiedlich orientierten Dove-Prismen unterscheiden sich auch die Wellenfronten in beiden Armen des Interferometers deutlich voneinander, wodurch es zu einer Phasendifferenz $\Delta\Phi(\Delta\mathbf{r}) \neq 0$ kommt. Diese resultiert in einer starken Deformation des Punktbildes.

Mittels der in Abschnitt 4.2 (Seite 33) beschriebenen Systemkorrektur konnten die Systemfehler bis zur zehnten Ordnung der Zernike-Polynome korrigiert werden. Das daraus resultierende Punktbild ist in Abbildung 5.6.d) dargestellt. Dessen HWB beträgt $(3,21 \pm 0,04) \mu\text{m}$, was einer Abweichung von unter 1 % zum theoretischen Wert von $3,19 \mu\text{m}$ entspricht. Ähnlich gering ist der Unterschied zwischen dem gemessenen und theoretischen Abstand der ersten Nullstellen. Die Werte betragen hier $(5,53 \pm 0,06) \mu\text{m}$ bzw. $5,52 \mu\text{m}$. Neben diesen geringen Abweichungen von den theoretisch erwarteten Werten rechtfertigt das Strehl-Verhältnis von 0,97 die Annahme, dass es sich hier um eine nahezu ideale beugungsbegrenzte Abbildung des Lichtpunkts handelt.

5.3.2 Phasenkorrektur im Bildfeld

Bei der Rekonstruktion von Strukturen, welche sehr viel größer als die IPSF waren, konnten neben vorwiegend reellwertigen Bildbereichen auch Regionen beobachtet werden, welche überwiegend imaginäre Bildwerte aufwiesen. Da die Abbildung mithilfe eines WIIM nach Gleichung 5.11 (Seite 43) linear bezüglich der Intensität ist, sollten mit einem aberrationsfreien System allerdings nur reelle Bildwerte messbar sein. Wie im Folgenden erläutert wird, können die beobachteten imaginären Anteile auf die Dove-Prismen zurückgeführt werden. Es wird gezeigt, dass es jedoch möglich ist, den Imaginärteil der Rekonstruktion zu minimieren und den Realteil entsprechend zu maximieren.

Das Licht eines jeden Objektpunkts durchläuft das BII unter einem bestimmten Winkel $\beta = (\beta_x, \beta_y)$ zur optischen Achse. Wie aus einfachen geometrischen Überlegungen folgt, führen verschiedene β innerhalb der Dove-Prismen und der Strahlteiler zu unterschiedlichen optischen Wegen in beiden Interferometerarmen. Abbildung 5.7 verdeutlicht diesen Sachverhalt anhand der um 90° zueinander gedrehten Dove-Prismen, welche von drei Lichtstrahlen unter verschiedenen Winkeln β_y ($\beta_x = 0^\circ$) durchlaufen werden. Im Fall des schwarz gestrichelt eingezeichneten Strahls ist $\beta_y = 0^\circ$, wodurch die optischen Wege in beiden Armen exakt gleich lang sind. Der rote und der blaue Lichtstrahl repräsentieren $\beta_y = +10^\circ$ und $\beta_y = -10^\circ$. Während sich die optischen Wege dieser beiden Strahlen in Arm 1 (Abbildung 5.7.a) unterscheiden, sind sie in Arm 2 (Abbildung 5.7.b) aus Symmetriegründen für beide Winkel identisch.

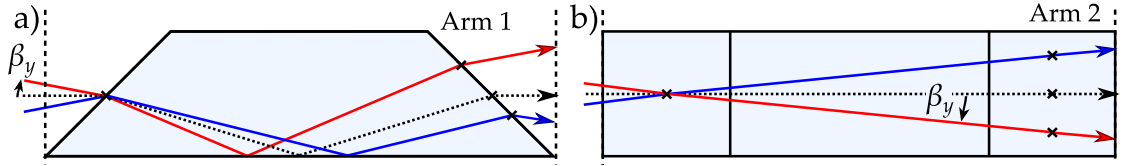


Abbildung 5.7: Schematische Darstellung des Strahlengangs innerhalb der Dove-Prismen am Beispiel von $\beta_y = 0^\circ$ (schwarz gepunktet), $\beta_y = 10^\circ$ (blau) und $\beta_y = -10^\circ$ (rot). Während die optischen Wege in Arm 1 für alle drei Winkel verschieden lang sind (a), sind sie in Arm 2 (b) für $\beta_y = 10^\circ$ und $\beta_y = -10^\circ$ geringfügig länger als für $\beta_y = 0^\circ$.

Aufgrund der Verknüpfung durch die Fouriertransformation folgt aus der reellwertigen Intensitätsverteilung im Objekt eine zur Inversionsachse symmetrische Kohärenzfunktion²⁷. Diese Symmetrie wird jedoch durch die winkelabhängige optische Wegdifferenz innerhalb der Prismen gestört, wodurch das rekonstruierte Bild der Objektstruktur I_R imaginäre Werte annimmt. I_R kann in diesem Fall durch die rein reelle Funktion I_R^r und die Phasenfunktion χ dargestellt werden:

$$I_R(\mathbf{s}) = I_R^r(\mathbf{s}) \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} \chi(\mathbf{s})\right) \quad (5.17)$$

$$I_R^r(\mathbf{s}) = \frac{\kappa}{(\lambda z)^2} \left[\text{IPSF}(\mathbf{s}) \otimes I_O\left(\frac{\mathbf{s}}{M(z)}\right) \right]. \quad (5.18)$$

Abbildung 5.8 zeigt den Einfluss von χ am Beispiel einer Aufnahme des Logos der Friedrich-Schiller-Universität Jena (FSU Jena). Es handelt sich dabei um eine lithografisch in Chrom geätzte Struktur, welche einen Ausschnitt von ca. $182 \mu\text{m} \times 182 \mu\text{m}$ darstellt. Als Lichtquelle kam eine rote LED ($\bar{\lambda} \approx 630 \text{ nm}$) zum Einsatz, wobei die räumliche Inkohärenz durch eine Köhlersche Beleuchtung mit $\text{NA}_{\text{bel}} = 0,40$ sichergestellt wurde. Aufgrund der spektralen Bandbreite $\Delta\lambda \approx 20 \text{ nm}$ wurde $\Gamma_{\lambda=633 \text{ nm}}$ mit der in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Technik aus der Fourier-Spektroskopie bestimmt. Hierfür wurde mithilfe eines Piezo-Aktuators zwischen den beiden Interferometerarmen ein optischer Wegunterschied von insgesamt $3,8 \mu\text{m}$ abgefahren und dabei 43 Interferogramme aufgenommen. Zur Verbesserung des Rauschverhaltens wurde die HighSNR-Funktion²⁸ der verwendeten Kamera mit einem Wert von 32 genutzt. In Abbildung 5.8.a) ist der Realteil der Objektstruktur I_R zu sehen, welcher auf Basis der gemessenen räumlichen Kohärenzfunktion rekonstruiert wurde. Der Einfluss der Phasenfunktion χ zeigt sich dadurch, dass neben Bereichen vorwiegend positiver Intensitäten auch Regionen überwiegend negativer Bildwerte auftreten; dazwischen ist I_R hauptsächlich imaginär. Abbildung 5.8.b) zeigt den Betrag $|I_R|$. Negative Bildanteile existieren hier nicht mehr und das Logo erscheint gleichmäßig ausgeleuchtet.

In dieser Darstellung fehlen jedoch auch die negativen Bildwerte. Diese tre-

²⁷ $\Gamma(-\Delta\mathbf{r}) = \Gamma^*(\Delta\mathbf{r})$

²⁸ Hierbei wird kameraintern über die entsprechende Anzahl von Bildern gemittelt.

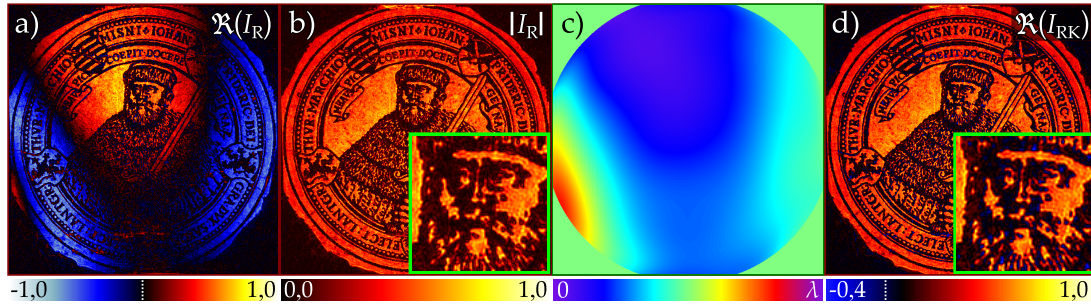


Abbildung 5.8: a) Realteil des interferometrisch rekonstruierten Logos der FSU Jena. b) Betrag der komplexwertigen Objektrekonstruktion. c) Die aus I_R bestimmte Korrekturphase χ_K . d) Realteil der mithilfe von χ_K korrigierten Objektrekonstruktion.

ten aufgrund der Struktur der IPSF besonders an Kanten oder feinen Strukturbestandteilen auf und können somit den Bildkontrast bei geeigneter Darstellung (Colormap²⁹) verbessern. Durch Multiplikation von I_R mit dem Korrekturterm $\exp\left(-i\frac{2\pi}{\lambda}\chi_K\right)$ ist es möglich, den Imaginärteil der Rekonstruktion zu minimieren und den Realteil zu maximieren. Dadurch bleiben die negativen Überschwinger an den Kanten im so korrigierten Bild I_{RK} erhalten, und folglich auch der verbesserte Kontrast. Die Korrekturphase χ_K kann experimentell durch das Anfitzen der Phasenfunktion $\chi = \arg(I_R)$ mit Zernike-Polynomen bestimmt werden (Abbildung 5.8.c). Hierfür wurde ein einfacher Algorithmus für Matlab³⁰ entwickelt, welcher im Folgenden zur Korrektur aller Aufnahmen verwendet wird. Für die gezeigten Messungen kamen Zernike-Polynome bis zur zehnten Ordnung zum Einsatz. Die phasenkorrigierte Rekonstruktion für das hier gezeigte Beispiel ist in Abbildung 5.8.d dargestellt. Daraus ist zu erkennen, dass es mithilfe von χ_K möglich ist, das Logo innerhalb des gesamten Bildfeldes gleichmäßig ausgeleuchtet zu rekonstruieren und gleichzeitig die negativen Überschwinger zu erhalten.

5.3.3 Zwei-Punkt-Auflösung

Nachdem in Abschnitt 5.3.1 die Punktbildverwaschungsfunktion des klassischen Mikroskops mit der des Weitfeldbildinversionsmikroskops verglichen wurde, soll im Folgenden das praktisch erreichbare Zweipunktauflösungsvermögen untersucht werden. Bei dem hierfür verwendeten Auflösungstestchart handelt es sich um einen chrombeschichteten Glasträger, in welchem lithografisch Doppelpunktstrukturen mit verschiedenen Abständen eingebracht sind. Es existieren insgesamt 16 Lochpaare mit Abständen zwischen $1,5\mu\text{m}$ und $4,4\mu\text{m}$. Der Durchmesser der Löcher beträgt jeweils $1\mu\text{m}$. Sie sind damit mehr als fünfmal kleiner als der Durchmesser der IPSF, weswegen die Löcher als quasi punktförmig angesehen werden können. Um eine möglichst homogene und räumlich inkohärente Ausleuchtung

²⁹ Mithilfe einer Colormap wird dem Grauwert eines Pixels eine Farbe zugeordnet. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer Falschfarbendarstellung.

³⁰ The MathWorks, Inc., Matlab 2013a

sicherzustellen, kam eine Köhlersche Beleuchtung mit einer roten Leuchtdiode ($\bar{\lambda} \approx 630 \text{ nm}$) als Lichtquelle zum Einsatz, wobei ZP040 ($\text{NA} = 0,40$) als Kondensor verwendet wurde. Aufgrund der spektralen Halbwertsbreite der LED von $\Delta\lambda \approx 20 \text{ nm}$ war die quasi-monochromatische Näherung nicht mehr gültig. Die Bestimmung von Γ erfolgte daher mittels des in Abschnitt 3.3.2 erläuterten spektroskopischen Verfahrens. Auch in diesem Fall wurden über eine Wegdifferenz von $3,8 \mu\text{m}$ 43 Interferogramme aufgenommen. Die interferometrische Rekonstruktion erfolgte auf Basis der räumlichen Kohärenzfunktion bei $\lambda_{j=6} \approx 633 \text{ nm}$, deren Betrag und Phase in Abbildung 5.9.a) und 5.9.b) zu sehen sind.

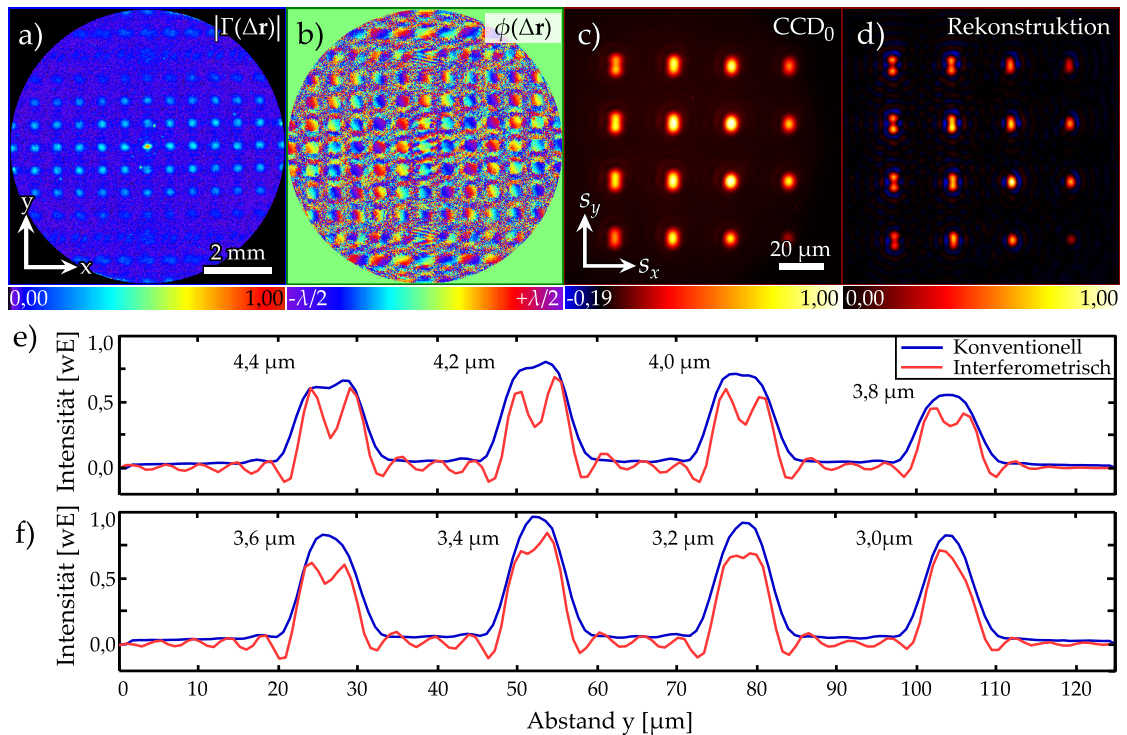


Abbildung 5.9: Betrag (a) und Phase (b) der räumlichen Kohärenzfunktion, aus welchen die Rekonstruktion der Punktpaare (d) erfolgte. Daneben ist die konventionelle Abbildung der Punktpaare (c) zu sehen. Die Grafiken e) und f) zeigen die Schnitte durch Punktpaare der ersten und zweiten Spalte in c) und d).

Abbildung 5.9.c) zeigt die konventionelle Vergleichsaufnahme der Doppelpunktstrukturen. Mit dem verwendeten MO_{det} beträgt der kleinste nach dem Rayleigh-Kriterium theoretisch noch auflösbare Abstand zweier Objektpunkte $5,49 \mu\text{m}$. Somit kann laut diesem Kriterium selbst das Punktpaar mit dem größten Abstand ($4,4 \mu\text{m}$, Abbildung 5.9.c) links oben) nicht mehr aufgelöst werden. Zwischen den jeweiligen Einzelpunkten sind aber dennoch schwache Intensitätsminima zu erkennen, welche in der interferometrischen Rekonstruktion (Abbildung 5.9.d) deutlicher ausgeprägt sind. Mithilfe des WIIA können auch bei Punktpaaren Minima beobachtet werden, bei welchen konventionell nur noch ein Maximum zu erkennen ist. Die Abbildungen 5.9.e) und 5.9.f) zeigen die Schnitte durch die erste und zweite

Spalte der Zweipunktstrukturen. Das Intensitätsminimum der konventionell abgebildeten Zweipunktstruktur ist bei einem Abstand von $4,4\text{ }\mu\text{m}$ vergleichbar zu dem der interferometrischen Rekonstruktion bei einem Abstand von $3,4\text{ }\mu\text{m}$. Hieraus lässt sich eine Steigerung der Zweipunktauflösung von ca. 23 % abschätzen. Da die Minima jedoch schwächer ausgeprägt sind als beim klassischen Rayleigh-Kriterium gefordert, ist es nicht sinnvoll, diesen Wert mit dem theoretisch vorhergesagten Auflösungsgewinn von 30 % zu vergleichen.

5.4 Einfluss von Abbildungsfehlern

In Kapitel 4.1 wurde bereits erläutert, wie sich innerhalb des DPI entstehende Wellenfrontdeformationen auf die messbare Kohärenzfunktion $\Gamma(\Delta\mathbf{r})$ auswirken. Dabei konnte gezeigt werden, dass die resultierenden Phasenfehler für Einfallswinkel β bis ca. $0,14^\circ$ mithilfe einer Referenzmessung korrigiert werden können. Dieser Ansatz wird im Folgenden auch auf Aberrationen erweitert, welche durch das Mikroskopobjektiv oder Phasenstörungen im Objektraum entstehen können.

Die Ursache für Aberrationen sind in der Mikroskopie je nach Anwendungsgebiet sehr verschieden. Im Bereich der Medizin oder Biologie beispielsweise ist es möglich, dass durch das Deckgläschen oder durch Brechzahlunterschiede zwischen der Probe und der Immersionsflüssigkeit sphärische Aberrationen induziert werden [111–117]. Da diese Wellenfrontfehler sowohl von den Brechzahldifferenzen als auch von der Eindringtiefe in die Probe abhängen, können sie nur mittels adaptiver Optiken effektiv reduziert werden [118–123]. In der Probe selbst kann es ebenfalls zu Brechzahlunterschieden und daraus resultierenden Wellenfrontdeformationen kommen [124–128]. Ähnliche Probleme treten beispielsweise auch bei der Fertigungskontrolle von LCD-Displays [129] auf. Hier wäre es wünschenswert, feine Strukturen mit hohen numerischen Aperturen aberrationsfrei durch dicke Schutzgläser hindurch abbilden zu können.

Im Rahmen des *coherence imaging* existieren verschiedene Methoden, um den Einfluss von Aberrationen auf die rekonstruierte Objektstruktur zu minimieren. Erste Ansätze kamen hierbei aus dem Bereich der Astronomie und sollten die Auswirkungen von Luftunruhen (*seeing*) auf die Bildgebung reduzieren. Diese Technik basiert auf vielen Kurzaufnahmen der Kohärenzfunktion und der anschließenden Mittlung der zugehörigen Phasenfunktionen [30–33, 97]. Sie eignet sich daher nicht für zeitlich konstante oder langsam variierende Aberrationen, mit welchen in der Mikroskopie zu rechnen ist. Eine weitere Möglichkeit stellen iterative Algorithmen zur Bildoptimierung dar. Der bereits in Kapitel 4.1 erwähnte Ansatz von Wagadarikar [107] basiert auf dem sogenannten *compressive sensing* [130]. Ist die Objektstruktur *sparse* [131], konvergiert der Algorithmus zu einem lokalen Mini-

mun und man erhält als Ergebnis die korrigierte Rekonstruktion der Objektverteilung sowie die Aberrationsfunktion. Während die Voraussetzung eines sparsen Objekts in der Mikroskopie in der Regel hinreichend erfüllt sein sollte, könnte die Tatsache, dass nur ein lokales, nicht aber zwingend das globale Minimum des Minimierungsproblems gefunden wird, in der Praxis zu Problemen führen. Eine Folge davon könnten verbleibende Aberrationen oder störende Artefakte sein. Dieser Vorschlag erscheint daher zweckmäßig, falls es nicht möglich ist, die Wellenfrontfehler durch eine Referenzmessung zu bestimmen. Beispiele aus der Mikroskopie mit adaptiver Optik zeigen jedoch, dass Phasenfehler durch die Verwendung sogenannter *guide stars* direkt bestimmt werden können [132–136]. Überträgt man diesen Ansatz auf die Weitfeldbildinversionsmikroskopie, können im Objektraum entstehende Wellenfrontfehler auf die gleiche Art und Weise numerisch korrigiert werden wie die Systemfehler [105].

5.4.1 Auswirkung von Aberrationen auf die interferometrische OTF

Um den Einfluss von vor dem BII entstehenden Wellenfrontaberrationen auf die Objektrekonstruktion zu untersuchen, wird die generalisierte Pupillenfunktion (Gleichung 2.11, Seite 9) in Abhängigkeit von den Ortsfrequenzen \mathbf{v} genutzt:

$$\mathcal{P}\left(\frac{\mathbf{v}}{\nu_{\max}}\right) = \text{circ}\left(\frac{\mathbf{v}}{\nu_{\max}}\right) \exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda}\Phi(\mathbf{v})\right). \quad (5.19)$$

Hierbei wird von einem Mikroskopobjektiv mit runder Pupille ausgegangen. $\Phi(\mathbf{v})$ entspricht den Phasenabweichungen der aberrierten von der idealen Wellenfront in der Ebene der Austrittspupille und kann somit als Aberrationsfunktion bezeichnet werden [55]. Im Folgenden wird angenommen, dass Φ unabhängig von der Position (\mathbf{r}, z) der Quellpunkte im Objektraum ist. Zwar ist diese Näherung im Allgemeinen nur für kleine Bereiche des Gesichtsfeldes gültig, mithilfe mehrerer Referenzmessungen an verschiedenen Orten kann dieses Problem jedoch gelöst werden.

Nach Gleichung 5.4 (Seite 41) ergibt sich die optische Übertragungsfunktion aus dem Produkt $\mathcal{P}(\mathbf{v}/\nu_{\max})\mathcal{P}^*(-\mathbf{v}/\nu_{\max})$. Im generalisierten Fall folgt daher:

$$\text{IOTF}\left(\frac{\mathbf{v}}{\nu_{\max}}\right) = \text{circ}\left(\frac{\mathbf{v}}{\nu_{\max}}\right) \exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda}\Delta\Phi(\mathbf{v})\right). \quad (5.20)$$

Demnach wird die interferometrische optische Übertragungsfunktion nur durch die Differenz $\Delta\Phi(\mathbf{v}) = \Phi(\mathbf{v}) - \Phi(-\mathbf{v})$ bestimmt. $\Delta\Phi(\mathbf{v})$ wird daher im Folgenden als *interferometrische Aberrationsfunktion* bezeichnet. Aufgrund der Differenzbildung enthält $\Delta\Phi$ keine zum Pupillenzentrum symmetrischen Anteile der Wellenfrontdeformationen, während punktsymmetrische Wellenfrontfehler doppelt eingehen. Stellt man $\Phi(\mathbf{v})$ im System der Zernike-Polynome (Abschnitt 2.2.2, Seite 10) dar, ergibt sich daraus, dass ausschließlich die ungeraden radialen Ordnungen der

Zernike-Polynome zur Aberrationsfunktion beitragen [105]:

$$\Delta\Phi(\mathbf{v}) = 2 \sum_{\substack{n=0, \\ \text{ungerade}}}^{\infty} \sum_{m=-n}^n c_n^m Z_n^m(\mathbf{v}). \quad (5.21)$$

Aberrationen wie beispielsweise der Astigmatismus $Z_2^{\pm 2}$, der Defokus Z_2^0 ³¹ oder die sphärische Aberration Z_4^0 beeinträchtigen die Bildqualität der interferometrischen Rekonstruktion somit nicht. Diese Eigenschaft kann daher besonders hilfreich beim Einsatz von Immersionsflüssigkeiten und Deckgläsern sein.

5.4.2 Numerische Aberrationskorrektur

Aufgrund des durch Gleichung 5.21 vermittelten Zusammenhangs verdoppelt sich allerdings der Einfluss von ungeradzahligen Zernike-Polynomen auf die IOTF. Sind die damit assoziierten Aberrationen so stark, dass die Objektrekonstruktion nicht mehr als beugungsbegrenzt angesehen werden kann, ist es möglich, diese durch eine numerische Aberrationskorrektur zu kompensieren. Wie auch bei der Bestimmung der Systemfehler (Kapitel 4.1, Seite 30) muss hierzu mindestens eine Referenzmessung durchgeführt werden. Dafür ist es notwendig, eine genau definierte Wellenfront durch das vollständige optische System (Mikroskopeinheit und BII) auf den Detektor abzubilden. Mithilfe reflektierender oder fluoreszierender Nano-Kügelchen (*guide stars*) können beispielsweise Kugelwellen direkt innerhalb der Probe erzeugt werden.

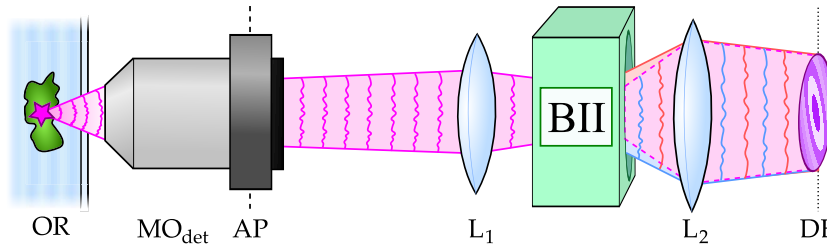


Abbildung 5.10: Messung der interferometrischen Aberrationsfunktion $\Delta\Phi_{\text{Exp}}$ mithilfe eines im Objektraum (OR) befindlichen *guide stars*.

Abbildung 5.10 stellt das Funktionsprinzip schematisch dar. Das von dem *guide star* ausgehende Licht breitet sich durch den Objektraum zur Eintrittspupille des Mikroskopobjektivs aus. Brechzahländerungen innerhalb des Objektraums verursachen dabei Deformationen der Wellenfront in der Austrittspupille des Mikroskopobjektivs. Die ungeraden Anteile dieser Aberrationen führen nach der Abbildung der Austrittspupille durch das BII hindurch zu charakteristischen Strukturen in-

³¹ Die quadratische Phasenkrümmung (Defokus), welche in der Austrittspupille entsteht, wenn sich ein Objektpunkt nicht in der Brennebene befindet, kann auch als Wellenfrontfehler interpretiert werden. Die dem System inhärente Korrektur dieser Aberration führt daher zu der unendlichen Schärfentiefe der rekonstruierten Objektstruktur.

nerhalb der Interferenzmuster. Die Auswertung dieser Interferogramme folgt dem gleichen Schema, wie es bereits in Kapitel 4.1 zur Bestimmung der Systemfehler beschrieben wurde. Aus mindestens drei Interferogrammen wird die komplexe Kohärenzfunktion berechnet, deren Phase ϕ_{Exp} der experimentell bestimmten interferometrischen Aberrationsfunktion $\Delta\Phi_{\text{Exp}}$ entspricht. Durch das Anfitten dieser Phasenfunktion mit Zernike-Polynomen können auch hier kohärente Störungen und durch Staubpartikel verursachte Beugungsstrukturen unterdrückt werden. Mithilfe der so erhaltenen Korrekturphase $\Delta\Phi_{\text{Korr}}$ ist es dann möglich, aus dem gemessenen Ortsfrequenzspektrum³² $\mathcal{G}_{\text{Exp}}(\mathbf{v})$ das korrigierte Spektrum $\mathcal{G}_{\text{Korr}}(\mathbf{v})$ zu berechnen [105, 137]:

$$\mathcal{G}_{\text{Korr}}(\mathbf{v}) = \mathcal{G}_{\text{Exp}}(\mathbf{v}) \exp\left(-i\frac{2\pi}{\lambda}\Delta\Phi_{\text{Korr}}(\mathbf{v})\right). \quad (5.22)$$

An dieser Stelle sei deutlich gemacht, dass die Phasenfunktion $\Delta\Phi_{\text{Korr}}$ sowohl die vor dem WIM entstehenden Aberrationen und die in Kapitel 4.1 diskutierten Systemfehler $\Delta\Phi_{\text{Sys}}$ erfasst. Soll die Art und Stärke der im Objektraum entstehenden Wellenfrontfehler $\Delta\Phi_{\text{OR}}$ bestimmt werden, ist es daher notwendig, $\Delta\Phi_{\text{Sys}}$ von $\Delta\Phi_{\text{Korr}}$ zu subtrahieren.

Da nur eine endliche Anzahl von Zernike-Polynomen für die Bestimmung von $\Delta\Phi_{\text{Korr}}$ berücksichtigt werden kann, ist eine vollständige Korrektur aller Wellenfrontfehler nicht möglich. In realen optischen Systemen nimmt der Wert der Zernike-Koeffizienten c_n^m für große n in der Regel jedoch schnell ab, weswegen dies in der Praxis keine Einschränkung darstellt. Da durch das Anfitten mit Zernike-Polynomen kohärente Artefakte minimiert werden sollen, ist es ratsam, n_{max} an die konkrete Anwendung und das verwendete optische System anzupassen. Das Ziel sollte sein, eine möglichst hohe Ordnung von Systemaberrationen zu korrigieren, ohne dass die zuvor genannten Störeinflüsse als Aberrationen fehlinterpretiert werden. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde $n_{\text{max}} = 10$ gewählt, wodurch eine Zerlegung von $\Delta\Phi_{\text{Exp}}$ in 66 Zernike-Polynome erfolgte.

5.4.3 Experimenteller Nachweis

Für den experimentellen Nachweis wurde zwischen dem Beobachtungsmikroskopobjektiv (ZP007) und der Objektebene ein Glasträger eingebracht, auf welchem sich ein dünner, transparenter Klebstofffilm befand. Dieser wurde während des Aushärtens mehrfach deformiert, wodurch sich eine unregelmäßige, klare Oberfläche ausbildete. Diese diente als Phasenobjekt, welches die vom Objekt ausgehenden Wellenfronten verzerrte. Zur Bestimmung der so erzeugten Wellenfrontfehler wurde der in Abbildung 5.11.a) skizzierte Laboraufbau verwendet. Da

³² Das Ortsfrequenzspektrum $\mathcal{G}(\mathbf{v})$ ergibt sich, wie in Abschnitt 5.1.2 erläutert, direkt aus der Kohärenzfunktion $\Gamma(\Delta\mathbf{r})$. Hierfür ist nur die Koordinatentransformation $\mathbf{v} = \Delta\mathbf{r}/(\lambda z)$ notwendig.

die Aberrationen erst nach dem Objekt entstanden, war es hier möglich, statt der bereits erwähnten Nanokügelchen ein in die Objektebene fokussiertes HeNe-Laserstrahlenbündel zu verwenden. Das mit dem ZP040 erzeugte Beugungsscheibchen war fast sechsmal kleiner als die Punktbildverwaschungsfunktion des Beobachtungsmikroskopobjektivs und konnte daher als punktförmig betrachtet werden. Die davon ausgehenden Kugelwellen wurden durch den Klebstofffilm (KF) deformiert und leuchteten anschließend die Austrittspupille des MO_{det} vollständig aus. Diese wurde durch das BII hindurch auf die CCD-Kamera abgebildet und wie zuvor beschrieben ausgewertet.

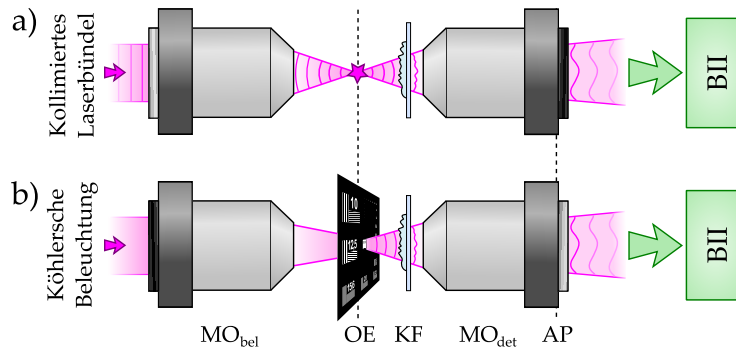


Abbildung 5.11: a) Messaufbau zur Bestimmung der interferometrischen Aberrationsfunktion $\Delta\Phi_{Exp}$. b) Aufnahme einer Objektstruktur unter dem Einfluss von im Objektraum entstehenden Aberrationen.

Nach der Bestimmung von $\Delta\Phi_{Korr}$ wurde, wie in Abbildung 5.11.b) dargestellt, ein Testchart mit einer Gitterstruktur in die Objektebene eingebracht. Um dieses Testchart räumlich inkohärent auszuleuchten, kam nun eine Köhlersche Beleuchtung mit der bereits zuvor verwendeten roten LED ($\bar{\lambda} \approx 630 \text{ nm}$, $\Delta\lambda \approx 20 \text{ nm}$) zum Einsatz. Deren Spektrum wurde mittels eines Spektralfilters zusätzlich auf eine Halbwertsbreite von ca. $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$ begrenzt. Zur Bestimmung der komplexen Kohärenzfunktion bei $\lambda_{j=6} = 633 \text{ nm}$ wurden über eine optische Wegdifferenz von $3,8 \mu\text{m}$ 43 Interferogramme aufgenommen und wie in Kapitel 3.3.2 (Seite 25) beschrieben ausgewertet. Das so erhaltene komplexwertige Ortsfrequenzspektrum \mathcal{G}_{Exp} enthielt sowohl die durch den Klebstofffilm hervorgerufenen Phasenfehler als auch die durch das BII verursachten Systemfehler. Um den Einfluss der Aberrationen auf die Bildgebung mithilfe des interferometrischen Verfahrens und des klassischen Mikroskops vergleichen zu können, war es notwendig, möglichst identische Rahmenbedingungen zu schaffen. Aus diesem Grund wurde das konventionelle Kontrollbild in diesem Versuchsabschnitt nicht vor dem Interferometer, sondern an dessen zweitem Ausgang³³ (Abbildung 5.5 (Seite 45), CCD_2) aufgenommen. Damit beinhaltet es sowohl den Einfluss der Systemfehler als auch die Auswirkungen der durch den Klebstofffilm verursachten Wellenfrontdeformationen.

³³ Zur Aufnahme des konventionellen Referenzbildes wurde ein Interferometerarm blockiert.

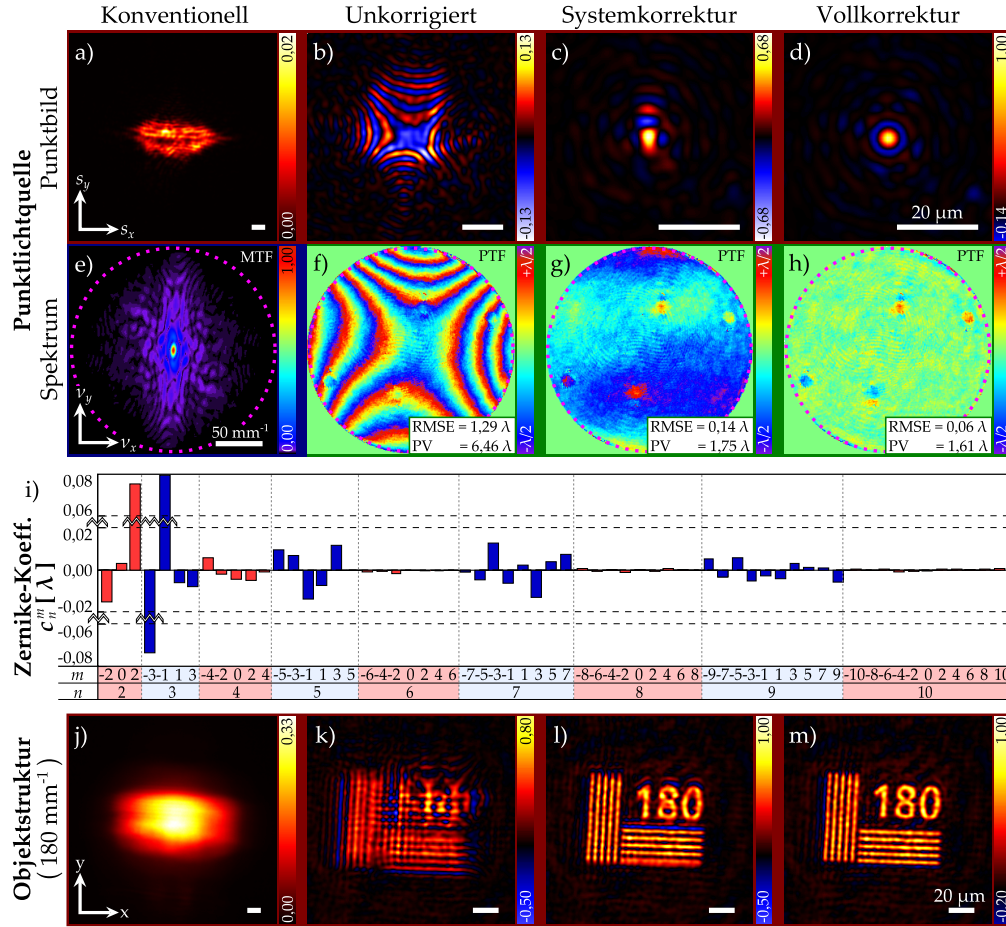


Abbildung 5.12: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Bestimmung des Punktbildes (a–h) und die Bilder der Gitterstruktur (j–m). Die erste Spalte stellt jeweils die Aufnahmen des konventionellen Mikroskops dar, während die zweite bis vierte Spalte die interferometrische Rekonstruktion mit den angegebenen Aberrationskorrekturen zeigt. Die Länge der eingezeichneten weißen Balken beträgt jeweils 20 µm. Zudem sind die Zernike-Koeffizienten nach der Systemkorrektur zu sehen (i).

Abbildung 5.12 fasst sowohl die Messungen des Lichtpunkts als auch die des Testcharts zusammen. In der ersten Zeile ist das Punktbild unter dem Einfluss der jeweiligen Aberrationen dargestellt. Dabei handelt es sich bei Abbildung 5.12.a) um die konventionelle Aufnahme, welche am zweiten Ausgang (CCD₂) des BII gemacht wurde. Mit einer Höhe von ca. 60 µm und einer Breite von ca. 130 µm ist das Punktbild etwa 5,5- bis 12-mal so groß wie das Airy-Scheibchen im beugungsbegrenzten Fall. Daneben ist die Rekonstruktion des Lichtpunkts auf Basis des unkorrigierten Spektrums \mathcal{G}_{Exp} gezeigt. Infolge der durch den Klebstofffilm verursachten punktsymmetrischen Aberrationen und der innerhalb des BII entstandenen Systemfehler ist auch dieses Punktbild stark deformiert und noch ca. 13-mal größer als die theoretische IPSF. Zudem können aufgrund der Phasenfehler starke negative Bildwerte beobachtet werden. Die Punktrekonstruktion nach Korrektur der Systemfehler ist in Abbildung 5.12.c) zu sehen. Hier kommen nur die durch den Klebstofffilm verur-

sachten Phasenaberrationen zum Tragen. Während die Struktur des Punktbildes horizontal kaum verbreitert ist, zeigt sich in vertikaler Richtung ein für die Koma typischer Schweif. Aufgrund dieser Verformung beträgt das Strehl-Verhältnis in diesem Fall nur ca. 0,67. Ganz rechts, in Abbildung 5.12.d), ist das vollständig korrigierte Punktbild dargestellt. Mit einem Nullstellenabstand von $(5,61 \pm 0,06) \mu\text{m}$ ist es nur ca. 4 % breiter als das idealisierte Punktbild. Das Strehl-Verhältnis beträgt hier 0,94, weswegen die Rekonstruktion als quasi beugungsbegrenzt betrachtet werden kann. Beim Vergleich der Bilder ist darauf zu achten, dass zur besseren Darstellung zum Teil unterschiedliche Skalierungen und Colormaps gewählt wurden. Der weiße Balken entspricht hierbei in jedem Bild $20 \mu\text{m}$.

Die darunterliegende Spalte verdeutlicht den Einfluss der Aberrationen auf die Übertragungsfunktionen. Abbildung 5.12.e) zeigt hierfür die MTF, welche durch die numerische Fouriertransformation des konventionellen Punktbildes berechnet wurde. Aufgrund der Wellenfrontfehler ist sie nur in einem kleinen Bereich³⁴ um das Zentrum größer als 0,1. Besonders in ν_x -Richtung ist die Kontrastübertragung stark eingeschränkt. Da die MTF des hier vorgestellten Verfahrens nahezu unabhängig von den Phasenaberrationen ist und bis zur Grenzfrequenz näherungsweise einen Wert von 1 aufweist³⁵, wurde in den Abbildungen 5.12.f)–h) die *Phasentransferfunktion* (PTF) dargestellt. Sie beschreibt die Phase der optischen Übertragungsfunktion OTF und ergibt sich aus der interferometrischen Aberrationsfunktion (Gleichung 5.20, Seite 53). Ausgehend von einem RMSE-Wert von $1,29 \lambda$ ohne Korrektur, führt die vollständige Aberrationskorrektur bis zur zehnten Ordnung zu einem Wert von $0,06 \lambda$. Dies entspricht einer Verbesserung um einen Faktor von rund 21,5. Der PV-Wert sinkt jedoch nur von $6,46 \lambda$ auf $1,61 \lambda$, und somit auf ein Viertel des Ausgangswertes. Die Ursache hierfür sind stark ausgeprägte Artefakte³⁶, welche durch die Entwicklung ins System der Zernike-Polynome bis zur zehnten Ordnung nicht erfasst und deshalb auch nicht korrigiert werden konnten. Durch den Abzug der Systemfehler von der unkorrigierten PTF erhält man die Aberrationen, welche infolge des Klebstofffilms im Objektraum entstehen. Abbildung 5.12.f) weist daher erwartungsgemäß eine deutliche Punktsymmetrie auf. Aufgrund der Entwicklung ins System der Zernike-Polynome kann der Beitrag der verschiedenen Aberrationen zum Gesamtwellenfrontfehler ermittelt werden, wobei die entsprechenden Zernike-Koeffizienten in Abbildung 5.12.i) dargestellt sind. Den überwiegenden Beitrag zum Gesamtwellenfrontfehler von $0,14 \lambda$ liefern demnach erwartungsgemäß die Wellenfrontfehler ungerader Ordnung mit einem RMSE-Wert von $0,12 \lambda$. Die Koma ($c_3^{\pm 1}$) und der Dreiblatt-Fehler ($c_3^{\pm 3}$) sind im gezeigten Beispiel besonders stark ausgeprägt. Es können aber auch signifikante Beiträge geradzah-

³⁴ Weniger als 4 % der auf 1 normierten MTF weisen Werte über 0,1 auf.

³⁵ Abweichungen von einem konstanten Verlauf entstehen vorrangig durch kohärente Artefakte.

³⁶ Hierbei handelt es sich um lokal scharf begrenzte Phasenstörungen, welche vermutlich aufgrund von Luftbläschen im Klebstofffilm verursacht wurden.

liger Ordnungen gemessen werden. Vor allem die zweite Ordnung trägt mit einem RMSE-Wert von ca. $0,07 \lambda$ deutlich zum Gesamtwellenfrontfehler bei. Die Ursache hierfür ist in der Ausbreitung des Lichts innerhalb des Interferometers zu suchen. Aufgrund der Aberrationen im Objektraum (Klebstofffilm) durchläuft das Licht im BII, verglichen mit dem aberrationsfreien Fall, unterschiedliche Wege. Dadurch kommt es zu anderen Einfallswinkeln an den Grenzflächen der Dove-Prismen. Dies führt wiederum dazu, dass sich besonders die Werte des Astigmatismus im Vergleich zur Referenzmessung unterscheiden. Entsprechende Wellenfrontfehler können daher auch nach der Systemkorrektur zurückbleiben. Die geradzahligen Aberrationen oberhalb der zweiten Ordnung haben insgesamt nur einen RMSE-Wert von ca. $0,01 \lambda$ und sind somit quasi vernachlässigbar.

Die vierte Spalte zeigt die Bilder des Testcharts. Hierfür wurde eine Gitterstruktur ausgewählt, welche mit 180 mm^{-1} nahe der Grenzfrequenz des optischen Systems von 221 mm^{-1} lag. Neben dem Gitter befand sich der Schriftzug "180", welcher ebenfalls Details nahe der Auflösungsgrenze enthielt. Die Abbildungen 5.12.j)–m) entsprechen den konventionellen Aufnahmen nach dem BII (CCD₂) sowie der unkorrigierten, der system-korrigierten und der vollständig korrigierten interferometrischen Rekonstruktion. Während die zweidimensionale Teststruktur konventionell abgebildet vollkommen unkenntlich ist, führt die systembedingte Korrektur der Aberrationen gerader Ordnung dazu, dass in Abbildung 5.12.k) bereits eine grobe Struktur wahrnehmbar ist. Durch die Systemkorrektur (Abbildung 5.12.l) kann sowohl die Gitterstruktur als auch der Schriftzug deutlich erkannt werden. Die durch den Klebstofffilm induzierten Aberrationen äußern sich hier vor allem durch eine Verwaschung in vertikaler Richtung. Die vollständige Korrektur mithilfe der gemessenen interferometrischen Aberrationsfunktion führt zu einer quasi beugungsbegrenzten Wiedergabe der zweidimensionalen Struktur (Abbildung 5.12.m).

5.5 Erweiterte Schärfentiefe

Die Herleitung der Abbildungseigenschaften eines WIIMs in Abschnitt 5.1 basierte auf der Annahme sehr kleiner numerischer Aperturen (paraxialer Fall) und aberrationsfreier Optiken. Bei beiden Voraussetzungen handelt es sich um Idealisierungen, welche in der Praxis niemals vollständig vorliegen können. Aus diesem Grund wird im Folgenden überprüft, wie groß die tatsächlich erreichbare Schärfentiefe eines WIIM im Vergleich zu einem konventionellen Mikroskop ist. Hierfür wird die Punktbildverwaschungsfunktion in axialer Richtung vermessen und untersucht, welche Einflüsse die Schärfentiefe gegebenenfalls limitieren. Dabei ist allerdings zu beachten, dass es bei entozentrischen Objektiven zu einer tiefenabhängigen Skalierung der Intensität des Punktbildes um den Faktor $1/(\lambda z)^2$ kommt. Es ist

daher möglich, dass das rekonstruierte Punktbild bei einem kleineren Abstand z trotz einer starken Verwaschung eine höhere Intensität aufweist als bei einer beugungsbegrenzten Darstellung in einer größeren Entfernung. Die in Abschnitt 2.1.5 (Seite 8) diskutierten Kriterien zur Charakterisierung der Schärfentiefe beziehen sich allerdings einzig auf den Intensitätsverlauf der Punktbildverwaschungsfunktion entlang der optischen Achse relativ zum Wert in der Fokusebene. Sie eignen sich daher nicht als Maß für die Tiefenausdehnung des Bereichs, in welchem mithilfe eines realen WIIM eine hinreichend scharfe Rekonstruktion möglich ist. Aus diesem Grund wird im Folgenden zuerst ein neues Kriterium erarbeitet, mit welchem die Schärfentiefe eines WIIM charakterisiert werden kann. Anschließend wird die mit dem Laboraufbau erreichbare Schärfentiefe bestimmt und mit der des klassischen Weitfeldmikroskops verglichen. Hierfür kommen zwei verschiedene Beobachtungsmikroskopobjektive zum Einsatz. Das bereits verwendete ZP007 besitzt eine sehr kleine NA von 0,07 und bildet Objekte entozentrisch ab. Zusätzlich wird die Bildgebung mithilfe des ZE040 untersucht. Dessen numerische Apertur ist mit 0,40 zwar deutlich größer als die des ZP007, sie genügt aber dennoch der paraxialen Näherung. Zudem befindet sich die Aperturblende hier in der hinteren Brennebene des Mikroskopobjektivs, wodurch auch die Abbildungseigenschaften für den telezentrischen Fall untersucht werden können.

5.5.1 Kriterium zur Quantifizierung der Schärfentiefe

Da die im Folgenden diskutierten Messungen unter paraxialen Bedingungen durchgeführt wurden, gibt es im Wesentlichen zwei mögliche Ursachen für eine tiefenabhängige Verwaschung der IPSF. Ist die durch das BII abgebildete Austrittspupille AP_{BII} des Mikroskopobjektivs nicht vollständig ausgeleuchtet, kann die räumliche Kohärenzfunktion nur in einem entsprechend kleineren Bereich bestimmt werden. Daraus folgt eine Verringerung der effektiven numerischen Apertur und dementsprechend eine Verbreiterung der IPSF. Ein Grund hierfür kann beispielsweise die Apertur des BII sein. Durch die Defokussierung des Quellpunkts kann das Wellenfeld innerhalb des Interferometers divergieren und somit seine laterale Ausdehnung vergrößern. Spiegel, Strahlteiler oder Dove-Prismen können daher in Abhängigkeit der Entfernung Δz des Quellpunkts von der Objektebene zu einer zusätzlichen Begrenzung der Wellenfront führen. Zudem ist es möglich, dass das Mikroskopobjektiv oder optische Elemente innerhalb des Interferometers Aberrationen verursachen, welche ebenfalls zu einer Verbreiterung der IPSF führen.

Mithilfe des in Kapitel 2.2.1 (Seite 9) erläuterten Strehl-Verhältnisses kann abgeschätzt werden, wie groß der Einfluss schwacher³⁷ Aberrationen auf die Abbildungsqualität eines konventionellen Weitfeldmikroskops ist. Es entspricht dem

³⁷ Wie in Kapitel 2.2.1 (Seite 9) dargelegt, sind die zur Definition des Strehl-Verhältnisses verwendeten Näherungen nur bis $SV \approx 0,6$ gültig.

Verhältnis der Intensität im Zentrum des aberrierten Punktbildes zu der des beugungsbegrenzten Punktbildes. Bei der Definition wird davon ausgegangen, dass die Ausleuchtung der Pupille in beiden Fällen identisch ist. Eine aufgrund von Wellenfrontfehlern und Abschattungen reduzierte Ausleuchtung der Austrittspupille wird daher nicht berücksichtigt. Darüber hinaus ist das klassische Strehl-Verhältnis nur in der Fokusebene definiert. Durch das *verallgemeinerte Strehl-Verhältnis*

$$\widetilde{SV}(\Delta) = \frac{(I)PSF_{\text{Exp}}(0,0,\Delta z)}{(I)PSF_{\text{Ideal}}(0,0,\Delta z)} \quad (5.23)$$

können diese beiden Aspekte mit einbezogen werden. \widetilde{SV} entspricht somit dem Verhältnis der gemessenen, aberrierten Punktbildverwaschungsfunktion $(I)PSF_{\text{Exp}}$ zur idealisierten Punktbildverwaschungsfunktion $(I)PSF_{\text{Ideal}}$. Beide Funktionen sind auf der optischen Achse und in derselben Ebene definiert, welche jedoch nicht die Fokusebene sein muss. Die $(I)PSF_{\text{Ideal}}$ ist hierbei das Punktbild, welches bei einer vollständig ausgeleuchteten Austrittspupille und in Abwesenheit von sämtlichen Aberrationen beobachtet werden würde. Das verallgemeinerte Strehl-Verhältnis lässt sich demnach wie folgt berechnen:

$$\widetilde{SV}_{\text{IF}}(\Delta z) = \frac{\iint_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{P}_{\text{Exp}}(\mathbf{r}, \Delta z) \mathcal{P}_{\text{Exp}}^*(-\mathbf{r}, \Delta z) d\mathbf{r}}{\iint \mathcal{P}(\mathbf{r}) \mathcal{P}(-\mathbf{r}) d\mathbf{r}} \quad (5.24)$$

$$\widetilde{SV}_{\text{Konv}}(\Delta z) = \frac{\left| \iint_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{P}_{\text{Exp}}(\mathbf{r}, \Delta z) d\mathbf{r} \right|^2}{\left| \iint \mathcal{P}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \right|^2}. \quad (5.25)$$

In Gleichung 5.24 und 5.25 wurde bereits berücksichtigt, dass \mathcal{P} im idealisierten Fall nicht von Δz abhängt. Interpretiert man den Δz -abhängigen Defokus auch als Aberration, wird der Nenner in Gleichung 5.25 ebenfalls unabhängig von Δz .

Neben der Tiefenabhängigkeit besteht der entscheidende Unterschied dieser Definition zu der aus Gleichung 2.13 (Seite 10) darin, dass sich die Pupillenfunktionen, welche zu $(I)PSF_{\text{Exp}}$ und $(I)PSF_{\text{Ideal}}$ führen, voneinander unterscheiden können. Während für $(I)PSF_{\text{Ideal}}$ von einer vollständig ausgeleuchteten Pupillenfunktion $\mathcal{P}(\mathbf{r})$ ausgegangen wird³⁸, ist zur Berechnung von $(I)PSF_{\text{Exp}}$ neben der Aberrationsfunktion Φ auch noch eine tiefenabhängige Apodisationsfunktion A zu berücksichtigen. \mathcal{P}_{Exp} lässt sich daher folgendermaßen beschreiben:

$$\mathcal{P}_{\text{Exp}}(\mathbf{r}, \Delta z) = A(\mathbf{r}, \Delta z) \mathcal{P}(\mathbf{r}) \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} \Phi(\mathbf{r}, \Delta z)\right). \quad (5.26)$$

³⁸ Je nach Konstruktion des Mikroskopobjektivs muss $\mathcal{P}(\mathbf{r})$ keine Kreisscheibe konstanter Transmission sein. Besonders bei höheren numerischen Aperturen kann es zu einer zusätzlichen Apodisation kommen [138], welche dann entsprechend in $\mathcal{P}(\mathbf{r})$ berücksichtigt werden muss. Im hier betrachteten paraxialen Fall ist dies jedoch nicht relevant.

Das so definierte Strehl-Verhältnis \widetilde{SV} berücksichtigt somit sowohl die Verbreiterung der PSF aufgrund von Aberrationen als auch durch eine reduzierte effektive numerische Apertur. Wie in Abschnitt 2.2.1 (Seite 9) erwähnt, geht man bis zu einem Strehl-Verhältnis von 0,8 von einer beugungsbegrenzten Abbildung aus. Dies entspricht dem gleichen Zahlenwert, welcher zur Definition der klassischen Schärfentiefe nach Gleichung 2.10 (Seite 8) verwendet wurde. Es bietet sich demnach an, $\widetilde{SV} > 0,8$ zur Bestimmung der Schärfentiefe eines WIIM zu verwenden. Der Zusammenhang zwischen der klassischen Definition der Schärfentiefe und dem \widetilde{SV} -Kriterium wird deutlich, wenn man berücksichtigt, dass eine Defokussierung im Rahmen der paraxialen Optik einer tiefenabhängigen quadratischen Wellenfrontdeformation $\Phi(\mathbf{r}, \Delta z) \sim \mathbf{r}^2 / \Delta z$ entspricht [55]. Dies bedeutet, dass \widetilde{SV} angewendet auf das klassische Weitfeldmikroskop im aberrations- und apodisationsfreien Fall exakt dem normierten Verlauf der PSF entlang optischen Achse entspricht:

$$\widetilde{SV}_{\text{Konv}} = \frac{\text{PSF}(0,0,\Delta z)}{\text{PSF}(0,0,0)} . \quad (5.27)$$

Das Kriterium $\widetilde{SV} > 0,8$ eignet sich daher auch zum Vergleich der Schärfentiefe der Weitfeldbildinversionsmikroskopie mit der der klassischen Weitfeldmikroskopie.

5.5.2 Experimentelle Bestimmung der erweiterten Schärfentiefe

Zur Bestimmung der Schärfentiefe des WIIM kam der bereits in Abbildung 5.5 vorgestellte Versuchsaufbau zum Einsatz. Die Untersuchungen wurden sowohl mit dem ZP007 (NA = 0,07) als auch mit dem ZE040 (NA = 0,40) durchgeführt, wobei die für die Aufnahme der konventionellen Vergleichsbilder notwendige Tubuslinse jeweils entsprechend angepasst wurde. Wie auch bei der Aufnahme der lateralen Struktur der Punktbildverwaschungsfunktionen in Abschnitt 5.3.1 (Seite 47) wurde das Punktobjekt durch die Fokussierung eines HeNe-Laserbündels in den Objektraum realisiert. Hierfür wurde im Fall des ZP007 das ZP040 (NA = 0,40) verwendet und im Fall des ZE040 das LF080 (NA = 0,80). Um den Einfluss der in Abschnitt 4.1 beschriebenen lateral ortsabhängigen Aberrationen zu minimieren, wurde darauf geachtet, dass sich der in den Objektraum projizierte Lichtpunkt immer auf der optischen Achse des Mikroskops befand.

Der Abstand Δz des Lichtpunkts zur Fokusebene konnte durch die axiale Verschiebung der Beleuchtungseinheit mithilfe des Schrittmotors SM₁ eingestellt werden. Die Aufnahmen wurden für jedes Objektiv sowohl mit dem klassischen Mikroskop als auch mit dem interferometrisch verbesserten System durchgeführt. Anhand der so erhaltenen Bilderstapel können axiale Schnitte durch die jeweiligen Punktbilder erstellt werden. Durch deren Vermessung war es anschließend möglich, einen qualitativen Eindruck der Schärfentiefe beider Systeme zu erhalten.

Trotz der einfachen Definition des Strehl-Verhältnisses ist dessen genaue experimentelle Bestimmung im klassischen Mikroskop nicht trivial³⁹. Aus den Aufnahmen des Punktbildes in der Fokusebene konnte jedoch geschlossen werden, dass beide Mikroskopobjektive eine nahezu beugungsbegrenzte Abbildung ermöglichen. Zudem waren während der konventionellen Vergleichsaufnahmen für die eingestellten Werte von Δz keine tiefenabhängige Apodisation erkennbar. Für die klassische Abbildung wird \widetilde{SV} daher aus $PSF_{Exp}(0,0,\Delta z)/PSF_{Exp}(0,0,0)$ berechnet.

Zur Bestimmung der Schärfentiefe des WIMM mussten für verschiedene Abstände Δz interferometrische Rekonstruktionen durchgeführt werden. Wie in den vorangegangenen Kapiteln, in denen der HeNe-Laser zum Einsatz kam, wurden dazu jeweils drei Interferogramme aufgenommen und daraus die komplexe Kohärenzfunktion bestimmt. Die Intensität der damit berechneten Punktbilder wurde daraufhin ins Verhältnis zum idealen Punktbild gesetzt. Um die $IPSF_{Ideal}$ zu berechnen, musste die Intensitätsverteilung innerhalb des ausgeleuchteten Bereichs der durch das BII hindurch abgebildeten Austrittspupille bestimmt werden. Diese Pupillenausleuchtung wurde anschließend auf die vollständige Austrittspupille interpoliert und daraus mittels Fouriertransformation die PSF_{Ideal} berechnet.

Carl Zeiss Jena, Planachromat (2,5x, 0,07)

Zur Bestimmung der konventionellen PSF wurde ein Bereich von $\pm 785 \mu m$ um die Fokusebene mit einer Schrittweite von $5 \mu m$ abgefahren. Durch eine numerische Interpolation des so aufgenommenen Bilderstapels war es möglich, die PSF in axialer Richtung mit einer Messunsicherheit von ca. $\pm 1 \mu m$ zu vermessen. Aufgrund der deutlich größeren axialen Ausdehnung der IPSF wurde zu deren Messung ein Bereich von $+6400 \mu m$ bis $-9300 \mu m$ ausgewählt⁴⁰. Die Schrittweite betrug in diesem Fall $50 \mu m$. Die Abbildungen 5.13.a) und 5.13.b) zeigen den direkten Vergleich der aufgenommenen axialen Schnitte durch die konventionelle und die interferometrische Punktbildverwaschungsfunktion. Die lateralen Bilder zu den darin farbig markierten Ebenen sind in den Abbildungen 5.13.c)–i) sowie 5.13.j)–p) dargestellt. Die Fokusebene ist pink gestrichelt markiert, während die Ebenen, in denen $\widetilde{SV} \approx 0,8$ beträgt, türkis gestrichelt eingezeichnet sind. In Anlehnung an das Schärfentiefe-Kriterium auf Basis der Halbwertbreite sind zudem die Abstände zur Fokusebene für $\widetilde{SV} \approx 0,5$ hellgrün gestrichelt dargestellt. Für die klassische Abbildung wurden des Weiteren diejenigen Ebenen gelb gestrichelt markiert, in welchen das Punktbild in axialer Richtung seine ersten Minima erreichte. Da für den interferometrischen Fall keine dem klassischen Verlauf vergleichbaren lokalen Minima

³⁹ Problematisch ist hierbei vor allem die genaue Bestimmung der Lichtleistung, welche durch Rauscheinflüsse und den Dunkelstrom des Detektors erschwert wird. Eine exakte Messung der tatsächlichen Lichtleistung des gemessenen Punktbildes ist jedoch essentiell zur Bestimmung des beugungsbegrenzten Referenzpunktbildes [139].

⁴⁰ Ein größerer Messbereich war mit dem Laboraufbau aus technischen Gründen nicht möglich.

gefunden werden konnten, zeigen die gelb markierten Abbildungen 5.13.j) und 5.13.p) die lateralen Schnitte durch die IPSF mit dem größten und dem kleinsten Abstand zum Mikroskopobjektiv. Aus den Messungen geht hervor, dass die ermittelte Schärfentiefe im klassischen Weitfeldmikroskop mit insgesamt $(103 \pm 1) \mu\text{m}$ etwas kleiner war als der erwartete Wert von $(113 \pm 6) \mu\text{m}$ ⁴¹.

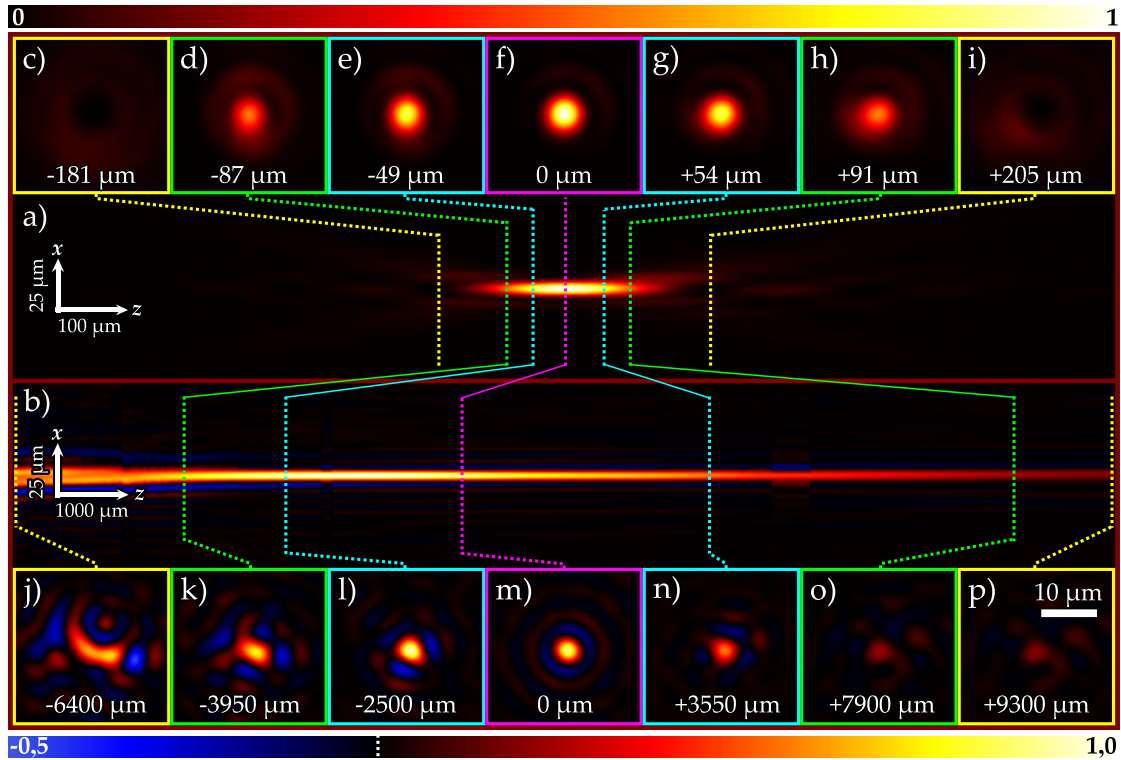


Abbildung 5.13: Vergleich der konventionellen PSF und der interferometrischen IPSF. Während a) den axialen Schnitt durch die konventionelle PSF darstellt, zeigen c)–i) die entsprechend markierten lateralen Schnitte. Im direkten Vergleich dazu ist in b) der axiale Schnitt durch die IPSF zu sehen. Die farblich markierten Ebenen sind in j)–p) dargestellt. (pink: Fokusebene, türkis: $\widetilde{SV} \approx 0,8$, grün: $\widetilde{SV} \approx 0,5$, gelb: erstes axiales Minimum (PSF) bzw. Messung mit maximaler Entfernung zur Fokusebene (IPSF))

Im Vergleich zum konventionellen Weitfeldmikroskop konnte beim WIIM eine deutlich erhöhte Schärfentiefe nachgewiesen werden. Nach dem, im vorangegangenen Abschnitt definierten, Strehl-Kriterium beträgt diese $(6050 \pm 25) \mu\text{m}$ und ist somit rund 58-mal größer als beim klassischen Mikroskop. Der axiale Schnitt durch das aufgenommene interferometrische Punktbild zeigt, dass die Ursachen der limitierten Schärfentiefe sowohl eine Verbreiterung als auch eine Verzerrung der lateralen Struktur der IPSF sind, welche mit wachsender Entfernung zur Foku-

⁴¹ Nach Gleichung 2.10 (Seite 8) wäre bei einer NA von 0,07 eine Schärfentiefe von ca. $129 \mu\text{m}$ zu erwarten gewesen. Durch Umbauten am WIIM kam es im Vergleich zu den Messungen aus vorangegangenen Abschnitten jedoch zu einer geringfügigen Änderung des Abstandes zwischen Mikroskopobjektiv und Tubuslinse. Dadurch verringerte sich die Gegenstandsweite, was zu einer Vergrößerung der wirksamen NA führte. Die Vermessung des Punktbildes ergab einen mittleren Abstand der ersten Minima von $(10,34 \pm 0,24) \mu\text{m}$. Daraus lässt sich eine effektive NA von $(0,075 \pm 0,002) \mu\text{m}$ abschätzen, was zu einer Schärfentiefe von $(113 \pm 6) \mu\text{m}$ führt.

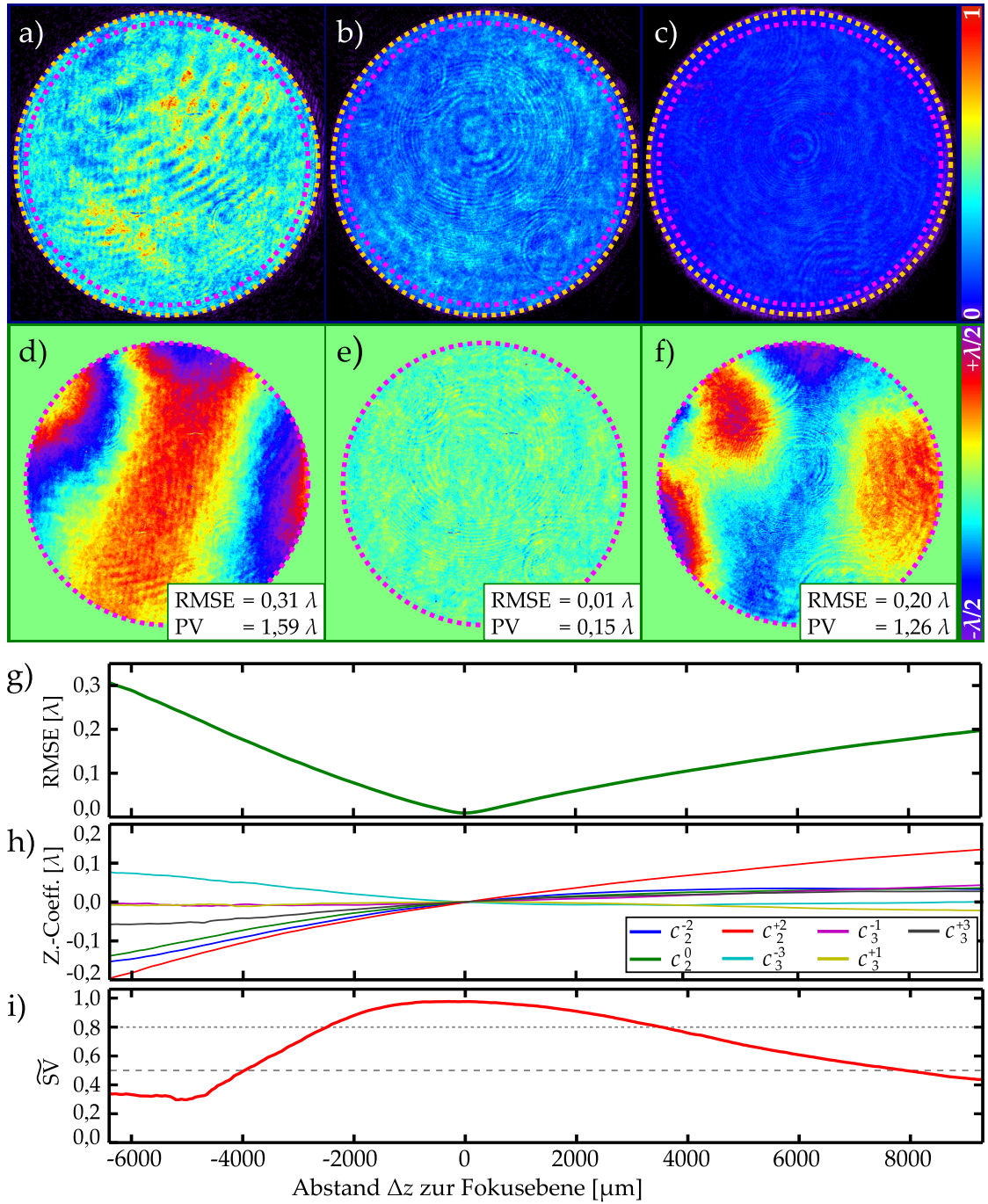


Abbildung 5.14: a)–c) Betrag der Kohärenzfunktion für verschiedene Abstände Δz . Der Rand der AP ist gelb gestrichelt markiert, während der zur Bestimmung der Zernike-Koeffizienten verwendete Bereich pink gestrichelt ist. d)–f) Phase der Kohärenzfunktionen für die entsprechenden Abstände Δz . g) Verlauf des RMSE-Werts des Gesamtwellenfrontfehlers. h) Zernike-Koeffizienten der zweiten und dritten radialen Ordnung. Für diese Darstellung wurden die Systemfehler bereits abgezogen. i) Abhängigkeit des verallgemeinerten Strehl-Verhältnisses von Δz .

sebene zunehmen. Der Grund hierfür lässt sich aus der Abhängigkeit der räumlichen Kohärenzfunktion von Δz erkennen. Die Abbildungen 5.14.a)–c) zeigen deren Betrag in der Austrittspupille für $\Delta z = -6400 \mu\text{m}$ (a), $\Delta z = 0 \mu\text{m}$ (b) und $\Delta z = +9300 \mu\text{m}$. Wie nach Gleichung 5.5 (Seite 42) zu erwarten war, sinkt der Betrag der Kohärenzfunktion mit wachsendem Abstand des Lichtpunkts zur Eintrittspupille für das entozentrische Mikroskopobjektiv. Da $|\Gamma|$ über die gesamte Austrittspupille unabhängig von Δz nahezu konstant ist, kann die Ausleuchtung der AP als Grund für die Deformation des Punktbildes ausgeschlossen werden.

Die Phasenverteilungen der Kohärenzfunktionen nach der Systemkorrektur sind jeweils darunter in den Abbildungen 5.14.d)–f) gezeigt. Wie bereits in Abschnitt 4.1 (Seite 30) beschrieben, wurden zur Auswertung durch das Laserlicht hervorgerufene Artefakte durch die Entwicklung der Phasenfunktion in das System der Zernike-Polynome bis zur zehnten Ordnung unterdrückt. Die folgenden Angaben beziehen sich daher auf die bereinigte Phasenfunktion. Befindet sich der Quellpunkt genau in der Fokusebene, können nahezu keine Aberrationen nachgewiesen werden ($\text{RMSE} \approx 0,01 \lambda$). Dort kann, wie in Abschnitt 5.3.1 (Seite 47) gezeigt, in guter Näherung von einer beugungsbegrenzten Abbildung ausgegangen werden. Wie in Abbildung 5.14.g) zu sehen ist, nimmt der RMSE-Wert der Aberrationen außerhalb der Fokusebene jedoch stetig zu, wobei über 98 % des RMSE-Werts des Gesamtwellenfrontfehlers durch Zernike-Polynome bis zur dritten Ordnung verursacht werden. Deren Verlauf ist daher in Abbildung 5.14.h) gesondert dargestellt. Der Astigmatismus $c_2^{\pm 2}$ ist hierbei am stärksten ausgeprägt, aber auch der Dreiblattfehler $c_3^{\pm 3}$ und der Defokus c_2^0 liefern signifikante Beiträge. Die Schärfentiefe des WIIM auf Basis des Dove-Prismen-Interferometers und in Verbindung mit dem ZP007 wird daher, innerhalb des untersuchten Messbereichs, ausschließlich durch die tiefenabhängigen Wellenfrontfehler beschränkt. Derartige tiefenabhängige Aberrationen konnten mit dem in [106] verwendeten UZ-Interferometer nicht beobachtet werden, weswegen mit einem solchen Interferometer deutlich größere Schärfentiefen möglich sein sollten.

Carl Zeiss, EC Epiplan (0,40, 20x)

Im Gegensatz zum ZP007 besitzt das ZE040 eine deutlich größere numerische Apertur und ist zudem für telezentrische Abbildungen konstruiert. Für die Bestimmung der Schärfentiefe im konventionellen Fall wurde die PSF in einem Bereich von ca. $\pm 60 \mu\text{m}$ um die Fokusebene herum mit einer Schrittweite von $0,4 \mu\text{m}$ aufgenommen. Wie im vorangegangenen Abschnitt wurde auch bei diesem Datensatz eine Interpolation in axialer Richtung durchgeführt. Dadurch war es möglich, die PSF axial mit einer Messunsicherheit von ca. $\pm 0,2 \mu\text{m}$ zu vermessen. Aufgrund der deutlich größeren Tiefenausdehnung der IPSF konnte zu deren Messung eine Schrittweite von $25 \mu\text{m}$ gewählt werden. Der Messbereich betrug hier $\pm 1500 \mu\text{m}$.

um die Fokusebene. Die Ergebnisse beider Messungen sind in Abbildung 5.15 zusammengefasst. Der in Abbildung 5.15.a) dargestellte axiale Schnitt durch das konventionelle Punktbild weist eine leichte Asymmetrie⁴² in axialer Richtung auf. Dies führt dazu, dass die Schärfentiefe mit $(4,3 \pm 0,2) \mu\text{m}$ etwas größer ist als der theoretische Wert von $3,96 \mu\text{m}$ für den aberrationsfreien Fall.

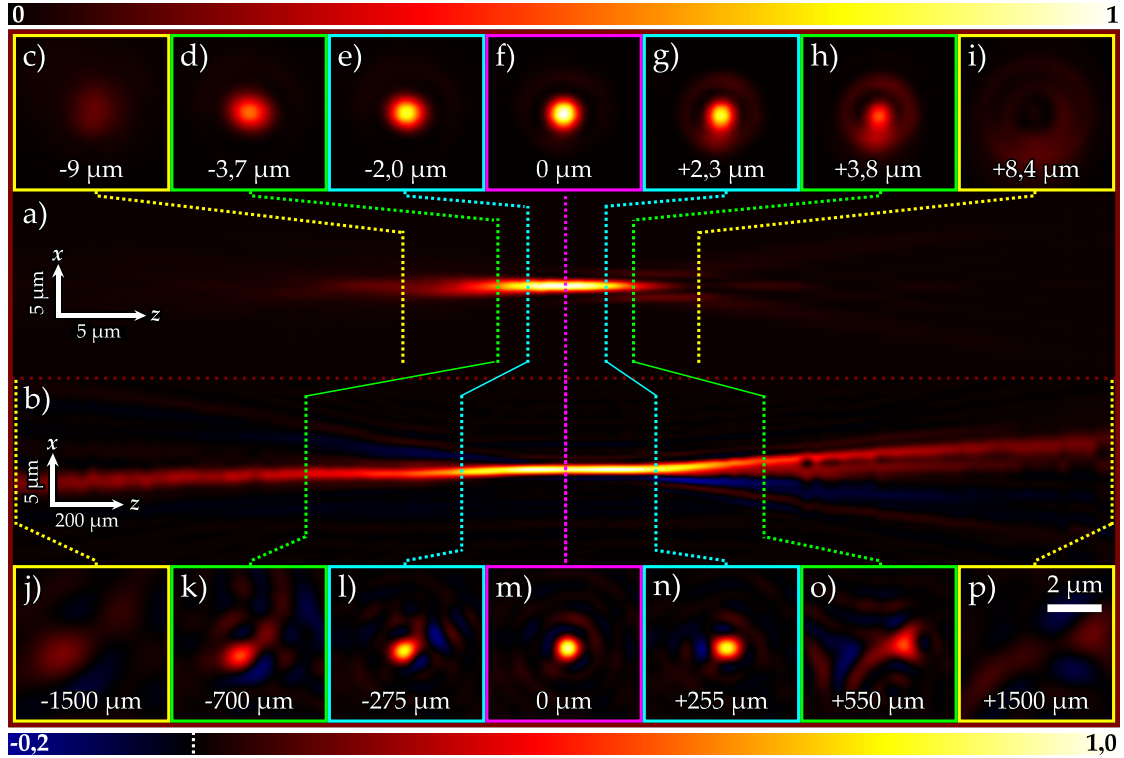


Abbildung 5.15: Vergleich der axialen Struktur des klassischen Punktbildes (a) mit der des interferometrischen Punktbildes (b). c)–p) Aufnahmen zu den jeweils farbig markierten Ebenen. (pink: Fokusebene, türkis: $\widetilde{SV} \approx 0,8$, grün: $\widetilde{SV} \approx 0,5$, gelb: erstes axiales Minimum (PSF) bzw. Messung mit maximaler Entfernung zur Fokusebene (IPSF))

Für die IPSF konnte eine Schärfentiefe von $(530 \pm 25) \mu\text{m}$ ermittelt werden. Sie ist damit ca. 123-mal so groß wie im klassischen Fall. Auch bei Verwendung dieses Mikroskopobjektivs kommt es aufgrund tiefenabhängiger Aberrationen mit wachsendem Abstand zur Fokusebene zu einer Verbreiterung und zu einer Deformation der IPSF. Wie aus Abbildung 5.16 zu erkennen ist, tragen hier jedoch nicht nur die in den Dove-Prismen entstehenden Wellenfrontfehler zur Verbreiterung der IPSF bei. Die Abbildungen 5.16.a) und 5.16.c) zeigen den Betrag der komplexen Kohärenzfunktion für die dem Mikroskopobjektiv nächste und entfernteste Position des

⁴² Die in den Abbildungen 5.15.c)–i) gezeigten lateralen Schnitte legen die Vermutung nahe, dass die Ursache hierfür eine schwache sphärische Aberration in Kombination mit einem Koma-Fehler ist. Da die klassische Abbildung unter Verwendung des ZP007 ebenfalls Anzeichen eines leichten Koma-Fehlers zeigt (Abbildung 5.13.d) & 5.13.h)), kann davon ausgegangen werden, dass der in Abbildung 5.5 mit ST_0 bezeichnete Umlenkspiegel für diesen Wellenfrontfehler verantwortlich ist. Die sphärische Aberration könnte damit erklärt werden, dass es mit dem verwendeten Versuchsaufbau nicht möglich war, die Tubuslänge von 165 mm einzuhalten. Eine Abweichung von dieser Norm kann zum Auftreten sphärischer Aberrationen führen.

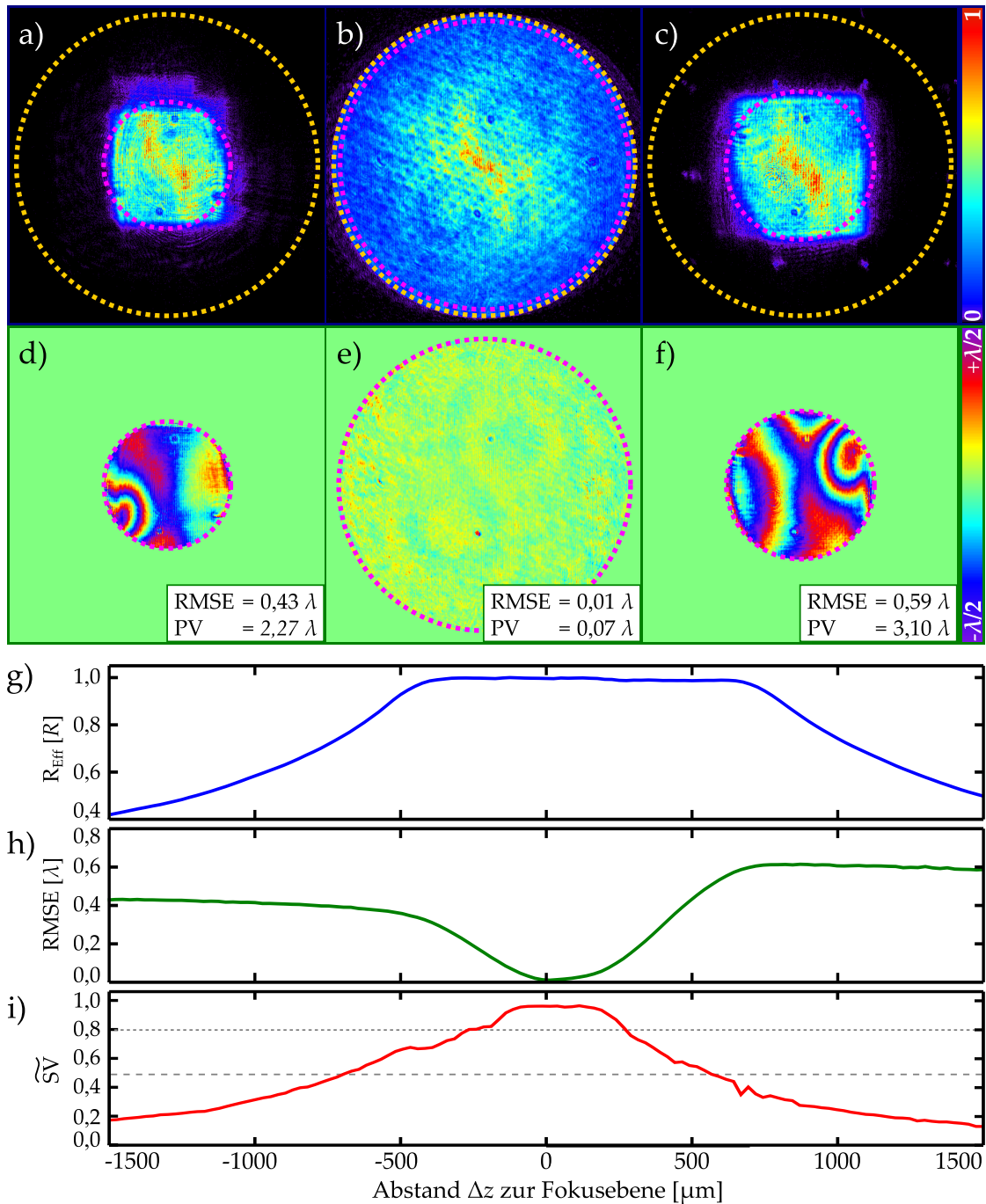


Abbildung 5.16: Während a)–c) den Betrag der komplexen Kohärenzfunktion bei einer Defokussierung von $-1500 \mu\text{m}$ (a), $0 \mu\text{m}$ (b) und $+1500 \mu\text{m}$ (c) zeigen, stellen die direkt darunterliegenden Abbildungen d)–f) die dazugehörigen Phasenverteilungen (modulo λ) dar. Die angegebenen RMSE und PV-Werte beziehen sich hier ebenfalls auf die angefitzte Phasenfunktion (Zernike-Polynome zehnter Ordnung). Der Rand der Austrittspupille ist gelb gestrichelt markiert, während die auswertbare Pupille pink gestrichelt eingezeichnet ist. g) zeigt den Radius der auswertbaren Pupille in Einheiten der AP, wohingegen h) den darin ermittelten RMSE darstellt. Das Strehl-Verhältnis \widetilde{SV} für die gemessene IPSF ist in i) eingezeichnet.

Lichtpunkts. In beiden Fällen ist zu erkennen, dass $|\Gamma|$ nur in einem kleinen zentralen Bereich messbar ist. Wie bereits dessen Form andeutet, ist die Ursache hierfür die begrenzte Apertur der beiden Dove-Prismen innerhalb des BII. Befindet sich der Quellpunkt in der Fokusebene, wird das Interferometer von einer Wellenfront mit einem bestimmten Krümmungsradius durchlaufen. Eine Defokussierung Δz führt zu einer zusätzlichen sphärischen Wellenfrontdeformation mit positivem bzw. negativem Krümmungsradius. Infolgedessen kann der Durchmesser des Lichtbündels am Ort der Dove-Prismen größer als deren freie Öffnung werden. Die Halterung der Prismen führt dann letztlich zu einer Abschattung des Lichts. Innerhalb des nicht abgeschatteten Bereichs ist der Betrag der Kohärenzfunktion allerdings über den gesamten Messbereich hinweg nahezu konstant. Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 (Seite 4) erwähnt wurde, ist dies eine Folge des telezentrischen Aufbaus. Der Radius der auswertbaren Kohärenzfunktion R_{Eff} ist in Abbildung 5.16.g) in Einheiten des Radius der Austrittspupille R dargestellt. In einem Bereich von ca. $\Delta z = -400 \mu\text{m}$ bis $\Delta z = +700 \mu\text{m}$ ist die Austrittspupille quasi vollständig ausgeleuchtet. In größeren Entfernungen setzt dann der Abschattungseffekt durch die Dove-Prismen ein. Während das Strehl-Verhältnis bei Verwendung des ZP007 einzig durch die tiefenabhängigen Wellenfrontfehler beeinflusst wurde, führt die begrenzte Ausleuchtung der AP_{BII} nun zu einer zusätzlichen Verbreiterung der IPSF.

Die Abhängigkeit des RMSE-Werts von Δz ist in Abbildung 5.16.h) dargestellt. Dabei fällt auf, dass der RMSE-Wert in den Bereichen, in welchen sich der Radius der ausgeleuchteten Austrittspupille ändert, nahezu konstant verläuft. Dies ist damit zu erklären, dass sowohl der RMSE-Wert des Gesamtwellenfrontfehlers als auch der Wert der Zernike-Koeffizienten [140, 141] von der Fläche des auswertbaren Bereichs abhängen. Es ist demnach davon auszugehen, dass die Aberrationen auch unterhalb von $\Delta z = -400 \mu\text{m}$ bzw. oberhalb von $\Delta z = +700 \mu\text{m}$ anwachsen. Das resultierende \widetilde{SV} ist schließlich in Abbildung 5.16.i) zu sehen.

Aus den durchgeführten Untersuchungen wird klar, dass tiefenabhängige Wellenfrontfehler bei beiden Mikroskopobjektiven zur Limitierung der Schärfentiefe beitragen. Eine numerische Korrektur dieser Aberrationen nach dem Schema aus Abschnitt 5.4.2 (Seite 54) ist nur im Spezialfall eines dünnen Objekts mit einem bekannten Abstand Δz zur Objektebene möglich. Sollen sehr dicke Proben untersucht werden, ist es daher notwendig, ein BII ohne derartige Tiefenabhängigkeiten zu verwenden. Auch die endliche Apertur des Interferometers und die nachfolgender Optiken führt zu einer Begrenzung der Schärfentiefe. Ab welcher Entfernung Δz von der Fokusebene dies geschieht, ist unter anderem vor allem vom verwendeten Mikroskopobjektiv, der freien Öffnung des Interferometers und dem Abstand zwischen der Austrittspupille und dem Detektor abhängig.

5.6 Rekonstruktion dreidimensionaler Objektstrukturen

Wie bereits in Abschnitt 5.1.2 (Seite 40) gezeigt, entspricht die in der Austrittspupille eines Mikroskopobjektivs gemessene räumliche Kohärenzfunktion dem Ortsfrequenzspektrum der räumlich inkohärenten Quellverteilung. Hierbei ist die Umrechnung der Pupillenkoordinaten in Ortsfrequenzen für telezentrische Objektive unabhängig von der axialen Position der Quellpunkte (Gleichung 5.13, Seite 43). Im entozentrischen Fall kommt es hingegen zu einer Abhängigkeit der Ortsfrequenzen vom Abstand der Quellpunkte zur Eintrittspupille (Gleichung 5.6, Seite 42). Die Rücktransformation kann jedoch nur für einen genau definierten Abstand durchgeführt werden, was, wie im Folgenden dargelegt wird, zu einem tiefenabhängigen Abbildungsmaßstab $M(z)$ führt. Im Anschluss daran wird die Auswirkung dieses Abbildungsmaßstabes auf die Rekonstruktion dreidimensionaler Strukturen diskutiert und an einem Beispiel demonstriert.

5.6.1 Tiefenabhängiger Abbildungsmaßstab

Die mithilfe eines BII in der Austrittspupille eines entozentrischen Mikroskopobjektivs gemessene räumliche Kohärenzfunktion ergibt sich zu:

$$\Gamma_{AP}(\Delta \mathbf{r}, z) = \frac{\kappa}{(\lambda z)^2} \mathcal{P} \left(\frac{\Delta \mathbf{r}}{R} \right) \iint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\boldsymbol{\rho}) \exp \left(-2\pi i \frac{\Delta \mathbf{r} \boldsymbol{\rho}}{\lambda z} \right) d\boldsymbol{\rho}. \quad (5.28)$$

Aus Gleichung 5.28 geht hervor, dass Γ_{AP} vom Abstand z der Intensitätsverteilung I_O zur Eintrittspupille, der Wellenlänge λ sowie von der Ortskoordinate \mathbf{r} in der Pupillenebene abhängig ist. Während λ als gegeben betrachtet wird, ist der Abstand z im Allgemeinen jedoch nicht bekannt. Im Fall einer ausgedehnten 3D-Struktur ist es nicht einmal möglich, einen Wert für z anzugeben. Mikroskopobjektive sind jedoch in der Regel für einen bestimmten Arbeitsabstand konstruiert. Geht man davon aus, dass sich die 2D-Objektstruktur in der Nähe dieser Referenzebene Σ_{z_0} mit dem Abstand z_0 zur EP befindet ($z \approx z_0$), bzw. die axiale Ausdehnung ΔZ eines 3D-Objekts sehr viel kleiner als z_0 ist ($\Delta Z \ll z_0$), erscheint es zweckmäßig, sich auf diese Entfernung als Rekonstruktionsabstand zu beziehen:

$$I_R(\mathbf{s}) = \frac{\kappa}{(\lambda z)^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{P} \left(\frac{\Delta \mathbf{r}}{R} \right) \iint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\boldsymbol{\rho}) \exp \left(-2\pi i \frac{\Delta \mathbf{r} \boldsymbol{\rho}}{\lambda z} \right) \exp \left(2\pi i \frac{\Delta \mathbf{r} \mathbf{s}}{\lambda z_0} \right) d\boldsymbol{\rho} d(\Delta \mathbf{r}).$$

Mithilfe des Faltungstheorems kann das Produkt im Integral über $d\boldsymbol{\rho}$ wie folgt dargestellt werden:

$$\begin{aligned}
 I_R(\mathbf{s}) &= \frac{2\kappa}{(\lambda z)^2} \left(\frac{J(2q\mathbf{s})}{2q|\mathbf{s}|} \right) \otimes \iiint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\rho) \exp \left(-\frac{2\pi i}{\lambda} \frac{\Delta \mathbf{r}}{z_0} \left[\mathbf{s} - \frac{z_0}{z} \rho \right] \right) d\rho d(\Delta \mathbf{r}) \\
 &= \frac{2\kappa}{(\lambda z)^2} \left(\frac{J(2q\mathbf{s})}{2q|\mathbf{s}|} \right) \otimes \iint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\rho) \delta \left(\rho - \frac{z}{z_0} \mathbf{s} \right) d\rho \\
 &= \frac{2\kappa}{(\lambda z)^2} \left(\frac{J(2q\mathbf{s})}{2q|\mathbf{s}|} \right) \otimes I_O \left(\frac{z}{z_0} \mathbf{s} \right). \tag{5.29}
 \end{aligned}$$

Der tiefenabhängige Abbildungsmaßstab entozentrischer Mikroskopobjektive ergibt sich demnach zu:

$$M(z) = z_0/z. \tag{5.30}$$

Damit kann die Objektrekonstruktion als Faltung der IPSF mit der um den Abbildungsmaßstab $M(z)$ skalierten Objektfunktion I_O beschrieben werden:

$$I_R(\mathbf{s}) = \frac{2\kappa}{(\lambda z)^2} \left(\frac{J(2q\mathbf{s})}{2q|\mathbf{s}|} \right) \otimes I_O \left(\frac{\mathbf{s}}{M(z)} \right). \tag{5.31}$$

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 (Seite 4) erwähnt wurde, entspricht die telezentrische Abbildung dem Grenzfall einer im Unendlichen liegenden Eintrittspupille. Ein Objektpunkt mit einer endlichen Entfernung Δz zur Fokusebene wird demnach immer mit einem konstanten Abbildungsmaßstab von 1 rekonstruiert⁴³. Wie gezeigt werden kann (Anhang A), ergibt sich der Vorfaktor in diesem Fall zu $2\kappa/(\lambda f_{MO})^2$.

Messung des tiefenabhängigen Abbildungsmaßstabs

Im Folgenden wird der Abbildungsmaßstab der beiden bereits verwendeten Mikroskopobjektive auf dessen Abhängigkeit vom Abstand z untersucht. Hierzu kam derselbe Versuchsaufbau wie in Kapitel 5.5.2 (Seite 62) beschrieben zum Einsatz. Im Unterschied dazu wurde das Laserbündel nun jedoch nicht auf die optische Achse des MO_{det} fokussiert, sondern in die Nähe der Ränder der jeweiligen Gesichtsfelder. Im Fall des ZP007 betrug der Abstand zur optischen Achse in der Referenzebene Σ_{z_0} 567 μm , was einem bildseitigen Hauptstrahlwinkel von 0,283° und somit ca. 66 % des Gesichtsfeldradius entsprach. Bezogen auf das Gesichtsfeld in Σ_{z_0} hatte der Quellpunkt im Fall des ZE040 eine Entfernung von 128 μm zur optischen Achse. Dies entsprach einem bildseitigen Hauptstrahlwinkel von 0,302°, wodurch am Ausgang des Interferometers für beide Mikroskopobjektive ein ähnlich dichtes Interferenzstreifenmuster beobachtet werden konnte.

Wie in Abschnitt 5.5.2 (Seite 62) wurde der Abstand Δz des Lichtpunkts zur Fokusebene mit dem Schrittmotor SM_1 verändert (siehe Abbildung 5.5, Seite 45).

⁴³ Mit $z = z_0 + \Delta z$ und somit $z_0 = z - \Delta z$ folgt für $z \rightarrow \infty$: $\lim_{z \rightarrow \infty} \left(\frac{z}{z_0} \right) = \lim_{z \rightarrow \infty} \left(\frac{z}{z - \Delta z} \right) = 1$.

Im Fall des ZP007 wurde auch hier ein Bereich von $\Delta z = -6400 \mu\text{m}$ bis $+9300 \mu\text{m}$ mit einer Schrittweite von $50 \mu\text{m}$ um die Fokusebene abgefahren. Für das ZE040 wurde ein Bereich von $\Delta z = -1500 \mu\text{m}$ bis $+1500 \mu\text{m}$ und eine Schrittweite von $50 \mu\text{m}$ genutzt. Zu jedem eingestellten Δz wurde die komplexwertige Kohärenzfunktion in der durch das BII abgebildeten Austrittspupille bestimmt und aus dem Anstieg ihrer Phasenfunktion der bildseitige Hauptstrahlwinkel w' berechnet. Da die Phasenverteilung nur auf modulo(λ) ermittelt werden kann, wurde hierzu ein Phasen-Unwrapping durchgeführt. Durch das Entwickeln der so erhaltenen stetigen Phasenfunktion in das System der Zernike-Polynome kann der lineare Phasenanteil (Tilt) bestimmt werden. Aus dessen PV-Wert lässt sich bei Kenntnis des Pupillenradius R der bildseitige Hauptstrahlwinkel $w'(\Delta z) = \text{atan}(\text{Tilt}(\Delta z)/(2R))$ berechnen. Da $w'(z)/w'(z_0)$ dem Verhältnis z_0/z entspricht⁴⁴, konnte so der tiefenabhängige Abbildungsmaßstab ermittelt werden.

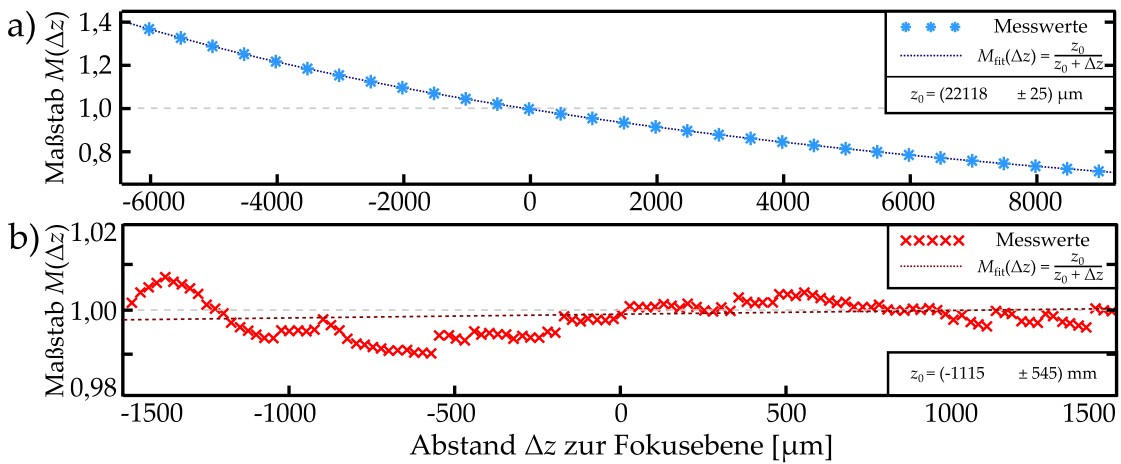


Abbildung 5.17: Abhängigkeit des Abbildungsmaßstabs M vom Abstand Δz zur Referenzebene Σ_{z_0} für das ZP007 (a) und das ZE040 (b). Zur besseren Darstellung wurde in a) nur jeder zehnte Messwert eingezeichnet. Die relative Messunsicherheit lag bei unter 3 %, sodass aus Gründen der Übersichtlichkeit auf Fehlerbalken verzichtet wurde.

Wie aus Abbildung 5.17.a) zu erkennen ist, sinkt $M(z)$ für das ZP007 mit wachsendem Δz . Während Objektstrukturen bei $\Delta z = -6400 \mu\text{m}$ beispielsweise um den Faktor $M = 1,40 \pm 0,03$ vergrößert dargestellt werden, kommt es für $z = +9300 \mu\text{m}$ zu einer um den Faktor $M = 0,71 \pm 0,02$ verkleinerten Rekonstruktion. Das Anfitzen der Messwerte mit dem für entozentrische Objektive zu erwartenden Funktionsverlauf $M(\Delta z) = \frac{z_0}{z_0 + \Delta z}$ liefert ein Bestimmtheitsmaß⁴⁵ von 0,999 86 sowie einen relativen Fehler von ca. 0,1 % für das durch den Fit ermittelte z_0 . Nach den so berechneten Werten befindet sich die Referenzebene Σ_{z_0} in einem Abstand von

⁴⁴ Für den objektseitigen Hauptstrahlwinkel gilt $\tan w = |\rho|/z$. Für kleine Winkel folgt daraus $w(z)/w(z_0) = z_0/z$. Da der objekt- und der bildseitige Hauptstrahlwinkel im entozentrischen Abbildungssystem linear miteinander verknüpft sind [51], ergibt sich $w'(z)/w'(z_0) = z_0/z$.

⁴⁵ Das Bestimmtheitsmaß berechnet sich hier aus dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten zwischen den Messwerten und dem angefitzten Kurvenverlauf. Es gibt den Anteil der durch die Fitfunktion erklärten Varianz der Messwerte an [142].

$z_0 = (22\,118 \pm 25) \mu\text{m}$ von der Eintrittspupille. Unter Berücksichtigung des Arbeitsabstands von $8,6 \text{ mm}$ [143] liegt die EP somit ca. $13,6 \text{ mm}$ innerhalb des ZP007. Diese Ergebnisse wirken plausibel und lassen den Schluss zu, dass das ZP007 durch die in Kapitel 5.1.2 gemachten Näherungen beschrieben werden kann.

Im Gegensatz dazu zeigt das ZE040 über den gesamten Messbereich von $3000 \mu\text{m}$ einen mit $M = 1,000 \pm 0,004$ quasi konstanten Abbildungsmaßstab. Ein Fit der in Abbildung 5.17.b) dargestellten Messwerte mit $M(\Delta z) = \frac{z_0}{z_0 + \Delta z}$ liefert für den Abstand der Referenzebene zur EP einen Wert von $z_0 = (-1115 \pm 545) \text{ mm}$. Der große relative Fehler von ca. 49% ist durch die starke Streuung der Messwerte zu erklären. Eine mögliche Ursache hierfür ist die mechanische Bewegung der Beleuchtungseinheit durch den Schrittmotor SM₁. Dadurch kann es zu kleinen Schwankungen⁴⁶ in der lateralen Position des fokussierten Laserbündels kommen, welche zu entsprechenden Veränderungen des Hauptstrahlwinkels führen und sich als scheinbare Änderung des Abbildungsmaßstabes äußern. Aus dem so ermittelten Wert für z_0 lassen sich jedoch zwei Aussagen ableiten. Zum einen ist z_0 mit $(-1,115 \pm 0,545) \text{ mm}$ selbst unter Berücksichtigung der hohen Messunsicherheit sehr viel größer als die ermittelte Schärfentiefe. Zum anderen ist der Wert negativ, was bedeutet, dass das Perspektivitätszentrum (EP) im positiv Unendlichen liegt. Die Eintrittspupille des ZE040 befindet sich demnach, von Σ_{z_0} aus betrachtet, in der zum Mikroskopobjektiv entgegengesetzten Richtung.

Um den Einfluss des tiefenabhängigen Abbildungsmaßstabs auf die Rekonstruktion ausgedehnter Strukturen mit dem ZP007 direkt nachweisen zu können, wurde ein Rechteckgitter mit einer Grundfrequenz von 200 mm^{-1} verwendet⁴⁷, welches für verschiedene Abstände Δz aufgenommen wurde. In diesem Versuchsabschnitt kam eine Köhlersche Beleuchtung mit einer Beleuchtungsapertur NA_{bel} von $0,40$ zum Einsatz. Als Lichtquelle wurde eine rote LED mit einer mittleren Wellenlänge von $\bar{\lambda} \approx 630 \text{ nm}$ gewählt, deren Spektrum mithilfe eines Filters auf eine HWB von $\Delta\lambda \approx 10 \text{ nm}$ begrenzt wurde. Die räumliche Kohärenzfunktion wurde mit dem in Abschnitt 3.3.2 (Seite 25) beschriebenen Ansatz aus der Fourier-Spektroskopie aus jeweils 43 Interferogrammen berechnet. Aufgrund der in Kapitel 5.5.2 (Seite 62) bereits ermittelten tiefenabhängigen Aberrationen war es möglich, die Abbildungsfehler für die entsprechenden Abstände Δz nach dem in Abschnitt 5.4.2 (Seite 54) beschriebenen Prinzip zu korrigieren. Zur besseren Auswertung konnte das Gitter somit über den gesamten axialen Bereich von $-6400 \mu\text{m}$ bis $+9300 \mu\text{m}$ aberrationsfrei dargestellt werden. Dies war jedoch nur möglich, da die genaue axiale Position des Gitters bekannt war und die Aberrationen für die jeweiligen Δz aus den Messungen von Abschnitt 5.5.2 bestimmt werden konnten.

⁴⁶ Die Schwankungen von M können bereits mit Ungenauigkeiten der lateralen Position des Lichtpunkts von $\pm 0,6 \mu\text{m}$ über den gesamten Messbereich erklärt werden.

⁴⁷ Die Grenzfrequenz ν_{max} (Gleichung 5.7, Seite 42) des optischen Systems lag bei ca. 236 mm^{-1} . Die Grundfrequenz des Gitters entsprach demnach ca. $0,84 \nu_{\text{max}}$.

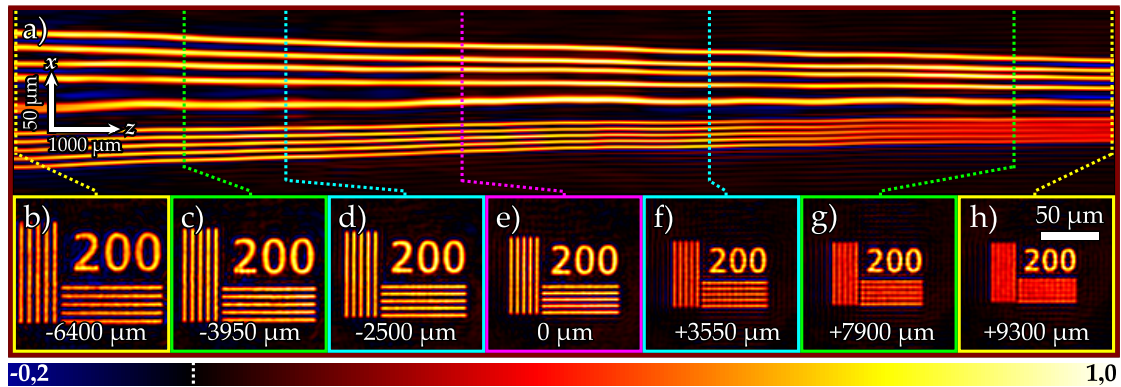


Abbildung 5.18: Rekonstruktion einer Gitterstruktur mit 200 mm^{-1} , aufgenommen mit dem ZP007 bei einer Wellenlänge von 630 nm . Während a) den axialen Schnitt durch den interferometrisch gewonnenen Bilderstapel darstellt, zeigen b)–h) die lateralen Schnitte durch die farbig markierten Ebenen.

Während Abbildung 5.18.a) den axialen Schnitt durch die Gitterstruktur zeigt, sind in den Abbildungen 5.18.b)–c) die entsprechend markierten Ebenen dargestellt. Erwartungsgemäß sinkt die scheinbare Größe der Gitterstruktur mit wachsendem Abstand $z = z_0 + \Delta z$ zur Eintrittspupille. Bezogen auf $z = z_0$ verringert sich der Abbildungsmaßstab M dabei von $1,35 \pm 0,04$ auf $0,76 \pm 0,03$. Zwar überschneiden sich die Fehlerbereiche dieser Messwerte mit denen aus dem vorangegangenen Abschnitt, dennoch scheint die Änderung des Abbildungsmaßstabs nahe der optischen Achse geringfügig niedriger zu sein als am Rand des Gesichtsfeldes. Eine Ursache hierfür könnten Wellenfrontdeformationen innerhalb des Interferometers sein. Zwar konnte deren Einfluss auf die Phasenfunktion der räumlichen Kohärenzfunktion durch die Systemkorrektur (Kapitel 4.1, Seite 30) minimiert werden, die Korrekturfunktion wurde jedoch durch eine Referenzmessung auf der optischen Achse gewonnen. Das Licht von achsenfernen Objektpunkten durchläuft das BII allerdings unter anderen Winkeln, wodurch es infolge der optischen Elemente im Interferometer zu Verzeichnungen kommen kann. Es ist jedoch möglich, diese mithilfe eines Kalibrierobjekts zu bestimmen und in der Nachverarbeitung zu korrigieren. Aufgrund der geringen Größe der möglichen Verzeichnung wurde dieser Ansatz im Rahmen der Arbeit nicht weiter verfolgt.

5.6.2 Perspektive der Objektrekonstruktion

Die bisherigen Betrachtungen beschränkten sich auf 2D-Objekte, welche sich im Objektraum in einer beliebigen Ebene senkrecht zur optischen Achse befinden. Wie in Abbildung 5.19.a) angedeutet, können 3D-Objekte aber als Aneinanderreihungen von 2D-Strukturen aufgefasst werden. Jeder in einer dieser Ebenen liegende Objektpunkt erzeugt auf dem Detektor am Ausgang des BIIs ein Interferenzstreifenmuster, dessen Orientierung und Periode durch den Hauptstrahlwinkel

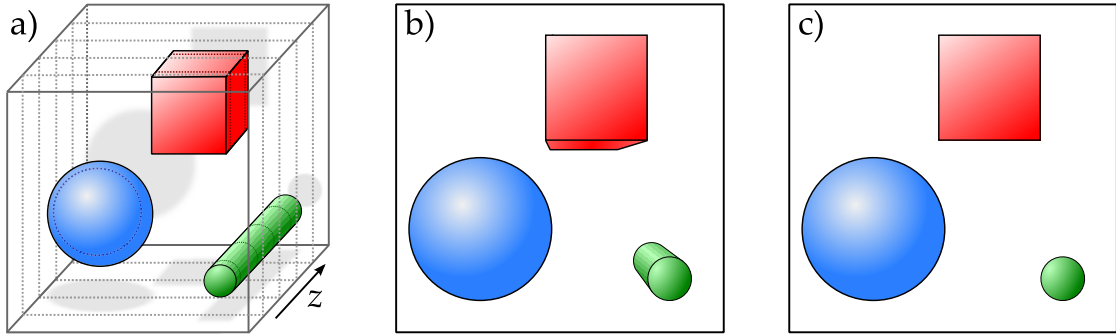


Abbildung 5.19: a) Darstellung einer 3D-Szene als Summe vieler Ebenen. Während es bei der entozentrischen Projektion (b) zu einer perspektivischen Verzerrung kommt, wird die Szene durch eine telezentrische Projektion (c) verzerrungsfrei wiedergegeben.

bestimmt ist (Kapitel 5.1, Seite 37). Aufgrund der vorausgesetzten räumlichen Inkohärenz überlagern sich die Streifenmuster ungestört, wodurch die beobachtbare Interferenzstruktur dem Realteil von $\Gamma(\Delta\mathbf{r}, z)$ entspricht. Dies gilt für Objektpunkte aus beliebigen Ebenen, wodurch die resultierende räumliche Kohärenzfunktion $\Gamma(\Delta\mathbf{r})$ bzw. das damit assoziierte Ortsfrequenzspektrum $\mathcal{G}(\mathbf{v})$ durch die Integrale

$$\Gamma(\Delta\mathbf{r}) = \int_{z_{\min}}^{+\infty} \Gamma(\Delta\mathbf{r}, z) dz \quad \text{bzw.} \quad \mathcal{G}(\mathbf{v}) = \int_{z_{\min}}^{+\infty} \mathcal{G}(\mathbf{v}, z) dz \quad (5.32)$$

dargestellt werden kann. Durch die untere Integrationsgrenze z_{\min} wird berücksichtigt, dass die Objektstruktur einen Mindestabstand zur Eintrittspupille aufweisen muss, da $\Gamma(\Delta\mathbf{r}, z)$ (Gleichung 5.5, Seite 42) für $z = 0$ m eine Singularität aufweist. Diese ist eine Konsequenz der verwendeten Näherungen.

Aus Gleichung 5.32 ergibt sich die rekonstruierbare Intensitätsverteilung der Objektstruktur mithilfe einer inversen Fouriertransformation zu:

$$I_R(\mathbf{s}) = \int_{z_{\min}}^{+\infty} I_R(\mathbf{s}, z) dz. \quad (5.33)$$

Im entozentrischen Fall lässt sich die interferometrische Rekonstruktion der Intensitätsverteilung in der Objektebene daher nach Gleichung 5.34 berechnen, während sie Gleichung 5.35 unter telezentrischen Bedingungen beschreibt.

$$\text{entozentrisch:} \quad I_R(\mathbf{s}) = \left(\frac{J_1(2q\mathbf{s})}{2q|\mathbf{s}|} \right) \otimes \int_{z_{\min}}^{+\infty} \frac{2\kappa}{(\lambda z)^2} I_O\left(\frac{z}{z_0}\mathbf{s}, z\right) dz \quad (5.34)$$

$$\text{telezentrisch:} \quad I_R(\mathbf{s}) = \left(\frac{J_1(2q\mathbf{s})}{2q|\mathbf{s}|} \right) \otimes \frac{2\kappa}{(\lambda f_{\text{MO}})^2} \int_{z_{\min}}^{+\infty} I_O(\mathbf{s}, z) dz \quad (5.35)$$

Das Bild kann demnach in beiden Fällen als die Faltung der zweidimensionalen IPSF mit der in die Referenzebene projizierten 3D-Objektverteilung I_O interpretiert werden. Handelt es sich bei dem Mikroskopobjektiv beispielsweise um eine einfache Linse, werden Strukturen nahe dem Mikroskopobjektiv mit einem größeren Abbildungsmaß rekonstruiert als weiter entfernte Objektbestandteile. Dies führt zu einer perspektivischen Verzerrung, welche einer Zentralprojektion [144] entspricht und in Abbildung 5.19.b) schematisch dargestellt ist. Für ein telezentrisch konstruiertes Mikroskopobjektiv ist der Abbildungsmaßstab unabhängig vom Abstand der Objektpunkte zur Eintrittspupille. Die durch Gleichung 5.33 beschriebene Projektion des Objekts in die Referenzebene Σ_{z_0} kann demnach als Parallelprojektion [144] interpretiert werden (Abbildung 5.19.c).

5.6.3 Aufnahme einer dreidimensionalen Struktur

In den vorangegangenen Abschnitten konnte bereits gezeigt werden, dass es mithilfe der Weitfeldbildinversionsmikroskopie möglich ist, punktförmige Objekte sowie 2D-Strukturen darzustellen, auch wenn deren Abstand zur Fokusebene einem Vielfachen der wellenoptischen Schärfentiefe entspricht. Der Nachweis des Funktionsprinzips anhand einer dreidimensional ausgedehnten Objektstruktur steht jedoch noch aus. Hierfür wird im Folgenden ein Modell des Eiffelturms verwendet, welches eine Grundfläche von ca. $800\text{ }\mu\text{m} \times 800\text{ }\mu\text{m}$ und eine Höhe von ca. $2500\text{ }\mu\text{m}$ besitzt. Zur Ausleuchtung des Modells kam nun eine Köhlersche Beleuchtung zum Einsatz, deren Lichtquelle eine Halogenlampe mit vorgesetztem Spektralfilter ($\bar{\lambda} \approx 660\text{ nm}$, $\Delta\lambda \approx 10\text{ nm}$) war. Damit das Modell nahezu vollständig abgebildet werden konnte, wurde als Beobachtungsmikroskopobjektiv das ZP007 verwendet, womit sich eine wellenoptische Schärfentiefe von $134,7\text{ }\mu\text{m}$ ergab.

Abbildung 5.20 zeigt eine Fotografie des Modells (Seitenansicht). Darin sind die Ebenen des Eiffelturms markiert, welche in Abbildung 5.21 scharf abgebildet zu

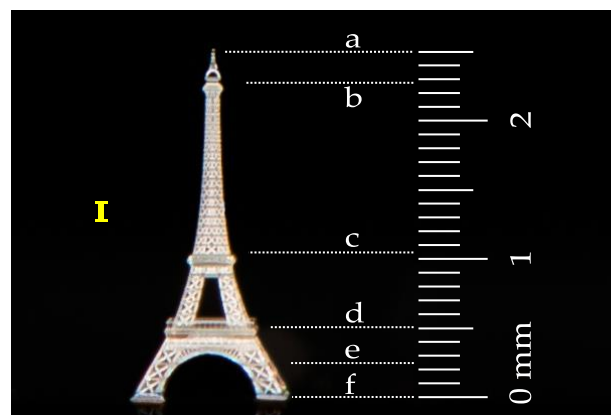


Abbildung 5.20: Fotografie des Eiffelturmmodells. Die Höhe des gelben Balkens links im Bild entspricht der wellenoptischen Schärfentiefe. Rechts sind die im Folgenden untersuchten Ebenen eingezeichnet, sowie deren Abstände von der Grundplatte.

sehen sind. Um diese konventionellen Vergleichsaufnahmen zu gewinnen, wurde das Objekt mithilfe des Schrittmotors SM₂ (Abbildung 5.5, Seite 45) um die angegebenen Abstände in axialer Richtung verschoben.

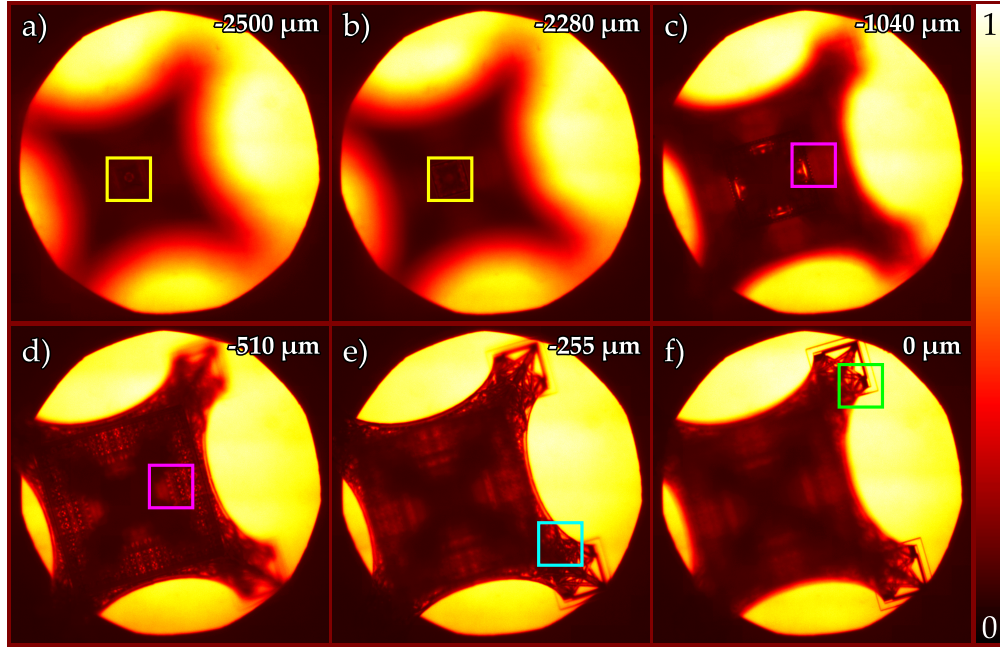


Abbildung 5.21: Konventionelle Abbildung von sechs verschiedenen Ebenen des Eiffelturmmodells. Einzelne Bildbereiche, welche sich jeweils in der Fokusebene befanden, sind durch farbige Quadrate markiert.

Die in den Abbildungen 5.21.a)–f) farbig eingezeichneten Quadrate weisen auf die Bereiche hin, in welchen jeweils eine oder zwei Ebenen des Eiffelturms scharf abgebildet werden. Diese Ausschnitte sind in der in Abbildung 5.22 dargestellten interferometrischen Rekonstruktion ebenfalls entsprechend markiert. Hierfür wurden insgesamt 126 Interferogramme ($\Delta\zeta_{\max} = 11,39 \mu\text{m}$) aufgenommen und daraus die komplexe Kohärenzfunktion Γ_{λ_j} für $\lambda_{j=18} = 632,8 \text{ nm}$ berechnet. Die im Vergleich zu den vorhergehenden Kapiteln größere maximale optische Wegdifferenz war notwendig, da der Eiffelturm das gesamte Gesichtsfeld ausfüllte. Auf den konkreten Zusammenhang zwischen der spektralen Bandbreite der Beleuchtung, dem Gesichtsfelddurchmesser und dem optischen Wegunterschied wird in Kapitel 5.7.2 (Seite 81) noch genauer eingegangen.

Während der Aufnahme der Interferogramme befand sich die Grundplatte des Modells (entsprechend Abbildung 5.21.f) in der Fokusebene des MO_{det}. Die Abbildungen 5.22.b)–e) zeigen die jeweiligen Bereiche in vergrößerter Darstellung. Die mittlere und die untere Plattform (Abbildung 5.22.c), der Stützpfeiler (Abbildung 5.22.d) sowie der Fuß des Turms (Abbildung 5.22.e) sind deutlich sichtbar und werden quasi beugungsbegrenzt wiedergegeben. Die Turmspitze sowie die oberste Plattform (3. Etage) sind aufgrund des niedrigen Kontrasts in Abbil-

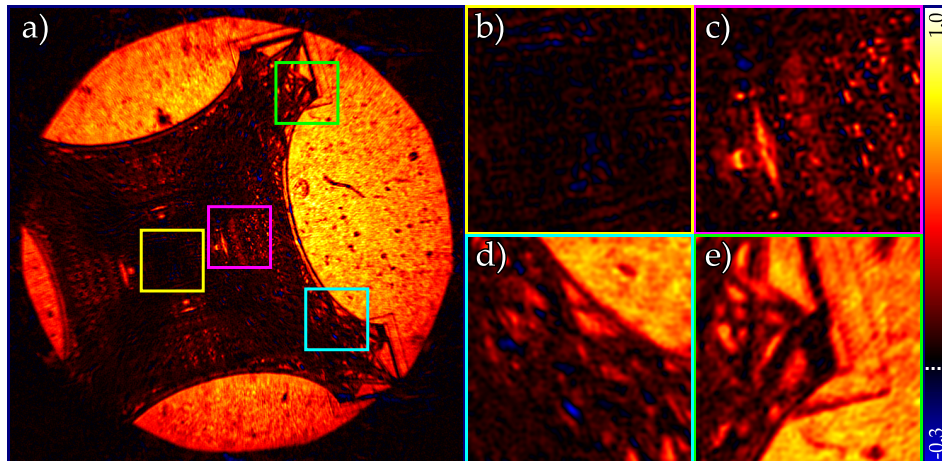


Abbildung 5.22: a) Interferometrische Rekonstruktion des Eiffelturmmodells. Die in Abbildung 5.21 farbig markierten Bereiche sind auch hier eingezeichnet und in b)–e) vergrößert dargestellt.

dung 5.22.b) allerdings kaum zu erkennen. Aufgrund der geringen Änderung des Abbildungsmaßstabs von theoretisch nur ca. 0,11 über die gesamte axiale Ausdehnung des Turms von etwa $2500\text{ }\mu\text{m}$ ist die perspektivische Verzerrung des entozentrischen Mikroskopobjektivs bei bloßer Betrachtung kaum wahrzunehmen. Durch die Vermessung der in den Abbildungen 5.21.c) und 5.22.a) gut erkennbaren dritten Plattform war es jedoch möglich, den in Kapitel 5.6.1 (Seite 71) ermittelten tiefenabhängigen Abbildungsmaßstab zu bestätigen. Die Kante dieser Plattform ist in der konventionellen Abbildung $(202 \pm 2)\text{ }\mu\text{m}$ lang, während ihre Länge interferometrisch dargestellt scheinbar $(212 \pm 2)\text{ }\mu\text{m}$ beträgt. Dies entspricht einer Vergrößerung um $(5 \pm 1)\%$, welche im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem Erwartungswert von $(4,934 \pm 0,006)\%$ übereinstimmt. Dieser ergibt sich auf der Basis der in Kapitel 5.6.1 gewonnenen Daten und des Höhenunterschiedes zwischen der Grundplatte und der beobachteten Ebene von ca. $1040\text{ }\mu\text{m}$.

5.7 Verwendung polychromatischen Lichts

In den vorangegangenen Kapiteln kam zur Beleuchtung der Testobjekte stets Licht mit niedriger spektraler Breite ($\Delta\lambda \ll \lambda$) zum Einsatz. Wie jedoch bereits in Kapitel 3.3.2 (Seite 25) erwähnt wurde, eignet sich die dort beschriebene Fourier-Spektroskopie-Methode auch für die Verwendung breitbandigen Lichts. Im Folgenden wird daher die Rekonstruktion mehrfarbiger Objektverteilungen untersucht und der Einfluss breitbandiger Lichtquellen auf die Struktur der IPSF diskutiert.

5.7.1 Spektrale Darstellung von Objekten

Der Einsatz breitbandigen Lichts erfordert die Aufnahme mehrerer Interferogramme, während innerhalb des Interferometers eine optische Wegdifferenz $\Delta\zeta_{\max}$ abgefahren wird (Kapitel 3.3.2, Seite 25). Aus den insgesamt J aufgenommenen Interferogrammen können mithilfe einer numerischen Fouriertransformation (*Fast Fourier Transform* [145], FFT) $J/2 + 1$ räumliche Kohärenzfunktionen berechnet werden, welche entsprechend viele Ortsfrequenzspektren $\mathcal{G}_{\lambda_j}(\mathbf{v}, z)$ repräsentieren. Hierbei ist zu beachten, dass der für alle Wellenlängen identische Radius R der Austrittspupille verschiedenen Grenzfrequenzen $\nu_{\max,j} = 2NA/\lambda_j$ entspricht. Die Umrechnung der ermittelten Kohärenzfunktionen in die Ortsfrequenzspektren erfolgt mithilfe von Gleichung 3.8 (Seite 26) und Gleichung 5.6 (Seite 42) mittels der Koordinatentransformation:

$$\nu_j = \frac{\Delta r}{R} \frac{NA}{\lambda_j}. \quad (5.36)$$

Mithilfe eines WIIM ist es daher möglich, verschiedenfarbige Details einer Objektverteilung voneinander getrennt zu rekonstruieren. Die spektrale Auflösung ist dabei sowohl von der maximalen optischen Wegdifferenz $\Delta\zeta_{\max}$ innerhalb des BILs als auch von der Wellenlänge λ_j abhängig (Abschnitt 3.3.2, Seite 25).

Zum experimentellen Nachweis der spektralen Rekonstruktion von Objektstrukturen wurde die Beleuchtungseinheit des Versuchsaufbaus entsprechend Abbildung 5.23 geändert. Da keine mehrfarbigen mikroskopischen Objekte zur Verfügung standen, wurden hierfür vier verschiedenfarbige Strukturen verkleinert in den Objektraum des Beobachtungsmikroskopobjektivs abgebildet. Dabei wurden die Brennweiten der Linsen L_1 bis L_4 sowie deren Abstände zum MO_{bel} so gewählt,

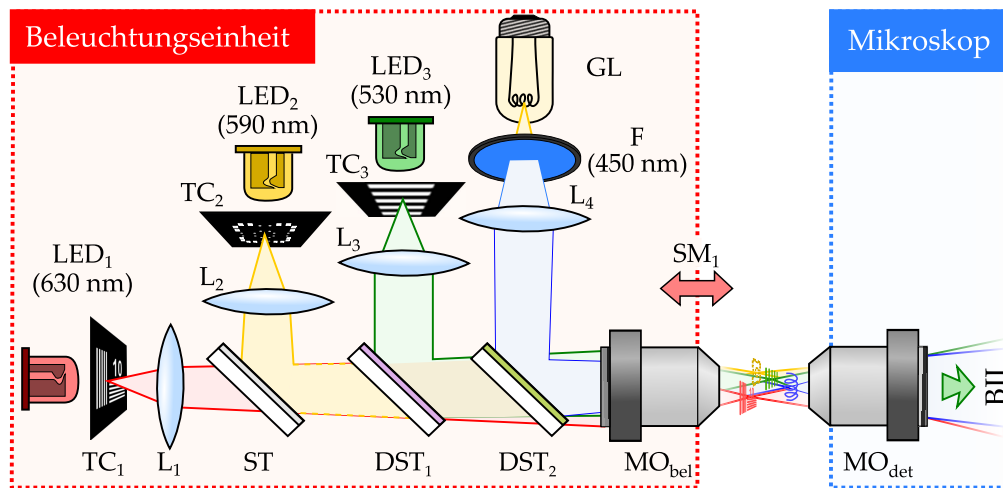


Abbildung 5.23: Schematische Darstellung der verwendeten Beleuchtungseinheit. (DST – Dichroitischer Strahlteiler, F – Filter, GL – Glühlampe, LED – Leuchtdiode, L – Linse, MO – Mikroskopobjektiv, TC – Testchart)

dass die Bilder der jeweiligen Strukturen im Objektraum des MO_{det} in verschiedene Ebenen abgebildet wurden. Während es sich beim MO_{det} um das ZP007 (2,5x/0,07) handelte, wurde die verkleinerte Abbildung mithilfe des ZE040 (20x/0,40) durchgeführt. Die erste Struktur bestand aus zwei rechtwinklig zueinander stehenden Gittern sowie der Zahl 10, welche mit einer roten LED ($\bar{\lambda} \approx 630 \text{ nm}$, $\Delta\lambda \approx 20 \text{ nm}$) beleuchtet wurden. Für die Beleuchtung des zweiten Objekts, bestehend aus einer Anordnung von Kreis- und Rechteckstrukturen, kam eine orange LED ($\bar{\lambda} \approx 590 \text{ nm}$, $\Delta\lambda \approx 20 \text{ nm}$) zum Einsatz. Als dritte Struktur wurde ein grobes Gitter verwendet, welches durch eine grüne LED ($\bar{\lambda} \approx 530 \text{ nm}$, $\Delta\lambda \approx 35 \text{ nm}$) ausgeleuchtet wurde. Für den blauen Spektralbereich fand eine Glühlampe in Verbindung mit einem Metallinterferenzfilter ($\bar{\lambda} = 450 \text{ nm}$, $\Delta\lambda \approx 10 \text{ nm}$) Verwendung.

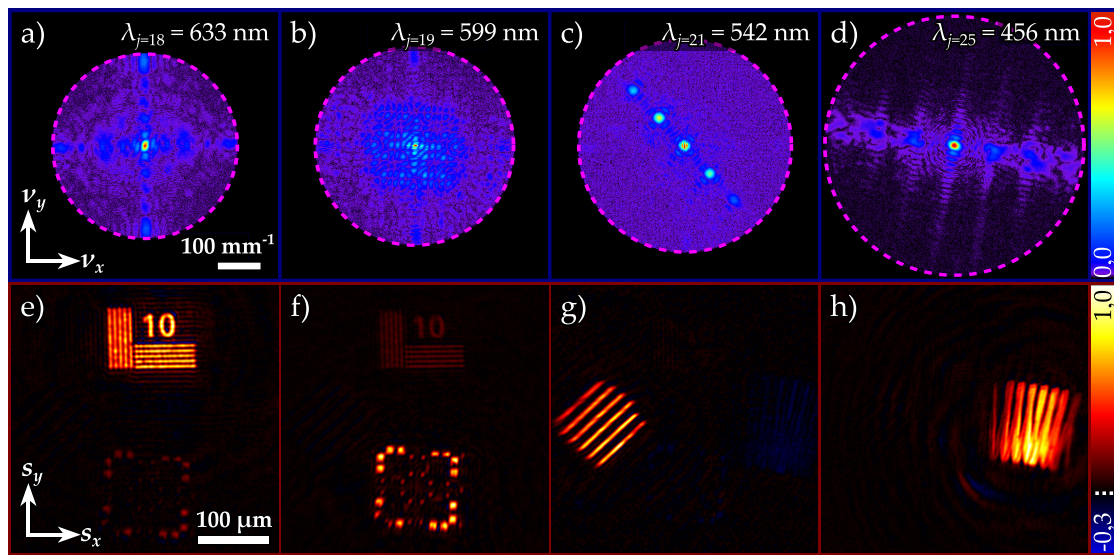


Abbildung 5.24: a)–d) Die aus den jeweiligen Γ_{λ_j} gewonnenen Ortsfrequenzspektren für die angegebenen Wellenlängen. e)–h) Interferometrische Rekonstruktionen auf Basis der darüber abgebildeten Spektren.

Um eine möglichst hohe spektrale Auflösung zu erhalten, wurde mit 126 Interferogrammen bei einer maximalen optischen Wegdifferenz von $11,39 \mu\text{m}$ gearbeitet. Nach der in Kapitel 3.3.2 (Seite 25) beschriebenen spektroskopischen Methode konnten somit 64 komplexwertige räumliche Kohärenzfunktionen ermittelt werden. Die oberen Grafiken in Abbildung 5.24 zeigen die mithilfe von Gleichung 5.36 berechneten Spektren für diejenigen Wellenlängen λ_j , welche den mittleren Wellenlängen der Lichtquellen am nächsten kommen. Darunter sind die daraus berechneten Objektrekonstruktionen zu sehen. Da sich die Spektren der roten und orangen LED überschneiden, können in den Abbildungen 5.24.e) und 5.24.f) noch die jeweils anderen Strukturen mit geringer Intensität erkannt werden.

In Abbildung 5.25 werden die konventionell aufgenommenen Bilder mit den interferometrischen Farbrekonstruktionen verglichen. Der Abstand Δz_{SM_1} der Be-

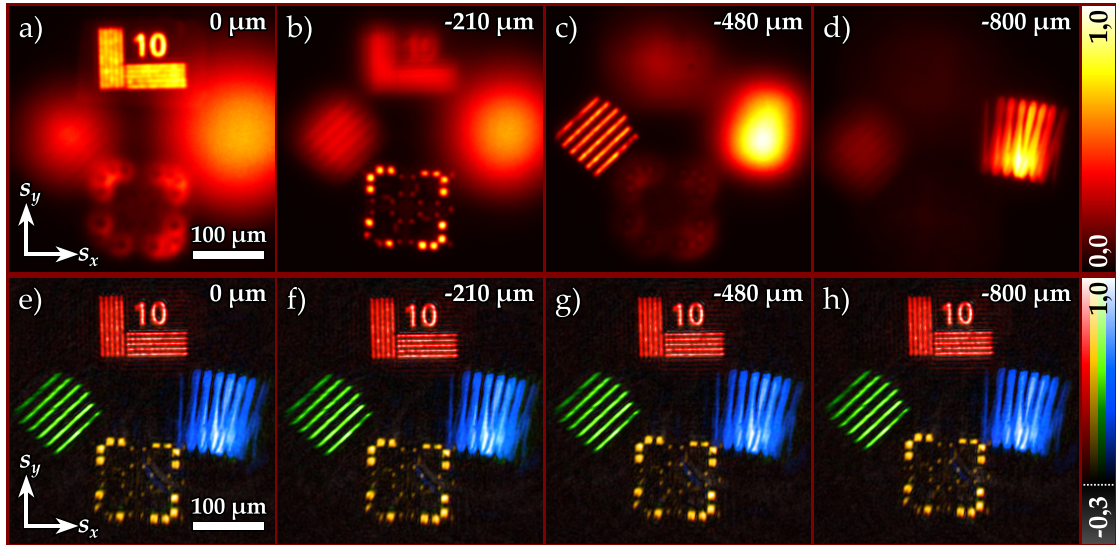


Abbildung 5.25: a)–d) Konventionelle Aufnahmen der farbig beleuchteten Strukturen. Der Abstand Δz_{SM_1} ist jeweils oben rechts angegeben. e)–h) Der mittleren Wellenlänge entsprechend eingefärbte spektrale Rekonstruktionen.

leuchtungseinheit von der Fokusebene des Beobachtungsmikroskopobjektivs wurde mithilfe von SM_1 so eingestellt, dass jeweils eine der Strukturen im klassischen Fall scharf dargestellt war. Bei den Farbrekonstruktionen handelt es sich um eine Überlagerung der in den Abbildungen 5.24.e)–5.24.h) gezeigten und entsprechend eingefärbten⁴⁸ Einzelrekonstruktionen. Aus den Abbildungen 5.25.e)–h) ist zu erkennen, dass alle Ebenen des axial über 800 μm ausgedehnten, mehrfarbigen Objekts gleichzeitig scharf und spektral aufgelöst dargestellt werden können. Die durch den tiefenabhängigen Abbildungsmaßstab entstehende perspektivische Verzerrung ist subjektiv kaum wahrnehmbar, wohl aber messbar. Die scheinbare Breite des durch orange Rechtecke dargestellten Quadrats verringert sich beispielsweise von ca. 114,1 μm bei $\Delta z_{SM_1} = 0 \mu\text{m}$ auf ca. 110,7 μm bei $\Delta z_{SM_1} = -800 \mu\text{m}$. Diese Beobachtung entspricht der durch den tiefenabhängigen Abbildungsmaßstab (Gleichung 5.30, Seite 71) zu erwartenden Verkleinerung auf ca. 97 %.

5.7.2 Einfluss der Kohärenzlänge auf die interferometrische PSF

Wird polychromatisches Licht verwendet, bestimmt die maximale optische Wegdifferenz $\Delta \zeta_{\text{max}}$ zwischen den Interferometerarmen nicht nur die spektrale Auflösung der Objektrekonstruktion. Sie kann, abhängig vom Hauptstrahlwinkel eines Objektpunkts, auch die laterale Struktur des Punktbildes beeinflussen und somit das nutzbare Gesichtsfeld beschränken. Um diesen Sachverhalt zu erläutern, wird

⁴⁸ Um den Wellenlängen eine Farbe im RGB-Raum [146] zuzuordnen, wurden von Glynn [147] erstellte Gleichungen verwendet. Diese basieren auf der Arbeit von Bruton [148]. Durch eine Konvertierung in den HSV-Farbraum [149] konnten daraus Colormaps erzeugt werden. Negative Bildwerte wurden in jeder Colormap mit einem linearen Grauwertverlauf von Schwarz (rel. Intensität 0) bis Weiß (rel. Intensität -1) berücksichtigt. Nach der Rücktransformation in den RGB-Raum konnten die Colormaps für die Darstellung in Matlab verwendet werden.

im Folgenden die Abbildung eines einzelnen, polychromatischen Objektpunkts mithilfe eines Weitfeldbildinversionsmikroskops betrachtet.

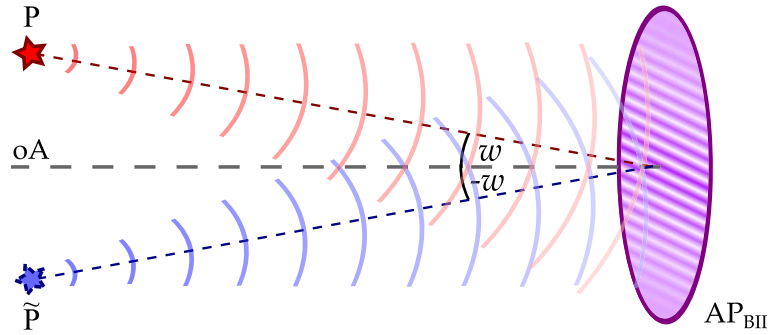


Abbildung 5.26: Entstehung von Interferenzstreifen in der durch das BII abgebildeten Austrittspupille AP_{BII} . Der Quellpunkt P im Objektraum ist rot markiert, während der aufgrund des BII scheinbar existierende zweite Quellpunkt \tilde{P} blau eingezeichnet ist.

Wie schematisch in Abbildung 5.26 dargestellt, überlagert sich das vom Quellpunkt P ausgehende Wellenfeld in der durch das BII abgebildeten Austrittspupille AP_{BII} mit seiner räumlich invertierten Kopie. Dadurch entstehen äquidistante Interferenzstreifen, welche senkrecht zu der vom Quellpunkt und der optischen Achse aufgespannten Ebene verlaufen. Der Interferenzterm der messbaren Intensitätsverteilung kann im Fall eines gaußförmigen Spektrums durch eine Kosinusfunktion und eine ebenfalls gaußförmige Einhüllende beschrieben werden (Abschnitt 2.3.2, Seite 14). Da ein einzelner Quellpunkt eine räumlich vollständig kohärente Feldverteilung erzeugt, wird der Interferenzkontrast V in der AP_{BII} ausschließlich durch die zeitliche Kohärenz bestimmt. Er ist daher eine Funktion der optischen Wegdifferenz, welche sich aus der Pupillenkoordinate r und die Längendifferenz zwischen beiden Interferometerarmen $\Delta\zeta_{IF}$ ergibt. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird die Problemstellung im Folgenden anhand eines Interferenzstreifenmusters diskutiert, welches parallel zur y -Koordinate verläuft. Die optische Weglängendifferenz $\Delta\zeta$ in der AP_{BII} ergibt sich damit zu:

$$\Delta\zeta(x, \Delta\zeta_{IF}) = 2x \sin(w) - \Delta\zeta_{IF} . \quad (5.37)$$

Der Interferenzterm I_{IF} ist dann eine Funktion der mittleren Wellenlänge $\bar{\lambda}$, der Kohärenzlänge l_c , der optischen Wegdifferenz $\Delta\zeta_{IF}$ und der Pupillenkoordinate x :

$$I_{IF}(x, \Delta\zeta_{IF}) = \mathcal{P}\left(\frac{x}{R}\right) C e^{-4 \ln(2) \left[\frac{2x \sin(w) - \Delta\zeta_{IF}}{l_c} \right]^2} \cos\left(\frac{2\pi}{\bar{\lambda}} [2x \sin(w) - \Delta\zeta_{IF}]\right) . \quad (5.38)$$

Als konstant angenommenen Parameter, wie beispielsweise die Intensität des Lichtpunkts, werden hierbei in der Konstante C zusammengefasst. Durch die Fouriertransformation von I_{IF} entlang der $\Delta\zeta_{IF}$ -Koordinate kann für jeden Ort x in der durch das BII hindurch abgebildeten AP ein Wellenlängenspektrum berechnet wer-

den. Aus der Ortsabhängigkeit von $\Delta\zeta(x)$ ergibt sich jedoch das Problem, dass der Weißlichtabgleich ($\Delta\zeta(x) = 0 \mu\text{m}$) an einem Punkt x innerhalb der AP_{BII} in Abhängigkeit von w für verschiedene $\Delta\zeta_{\text{IF}}$ erreicht wird. Im Zentrum ($x = 0 \mu\text{m}$) befindet sich das Kontrastmaximum beispielsweise bei $\Delta\zeta_{\text{IF}} = 0 \mu\text{m}$. $I_{\text{IF}}(0, \Delta\zeta_{\text{IF}})$ ist somit symmetrisch bezüglich $\Delta\zeta_{\text{IF}}$, weswegen von einem zweiseitigen⁴⁹ Interferogramm [99, 100] gesprochen wird. Außerhalb des Zentrums der AP_{BII} verschiebt sich das Interferenzmaximum jedoch zunehmend in die Randbereiche des aufgenommenen Interferogramms. Für hinreichend große w bzw. x kann ein sogenanntes einseitiges Interferogramm [99, 150] gemessen werden. Als Folge dieser von x abhängigen Lage des Abgleichspunkts im Interferogramm wird für jeden Punkt innerhalb der AP_{BII} ein anderes Wellenlängenspektrum und somit auch ein anderes $\Gamma_{\lambda}(x)$ rekonstruiert. Daher sind sowohl die Phase als auch der Betrag der Kohärenzfunktion innerhalb der Austrittspupille eine Funktion von w . Dies wiederum führt zu einer entsprechend ortsabhängigen Struktur des Punktbildes.

Betrachtet man $\Gamma_{\lambda}(x)$ bei der mittleren Wellenlänge $\bar{\lambda}$ eines gaußförmigen Spektrums, so zeigt eine ausführlichere mathematische Diskussion (Anhang D), dass sich die Struktur von $\Gamma_{\bar{\lambda}}(x)$ näherungsweise durch eine Faltung der Einhüllenden des Interferenzstreifenmusters (Interferenzkontrast) mit einer Rechteckfunktion der Breite $\Delta x_{\text{max}} = \Delta\zeta_{\text{max}}/(2 \sin(w))$ ausdrücken lässt:

$$\Gamma_{\bar{\lambda}}(x) = \mathcal{P}\left(\frac{x}{R}\right) e^{i\frac{2\pi}{\bar{\lambda}}2x \sin(w)} \sin(w) \left[e^{-4 \ln(2) \left[x/\hat{l}_c \right]^2} \otimes \text{rect}(x, \Delta x_{\text{max}}) \right] \quad (5.39)$$

$$\text{rect}(x, \Delta x) = \begin{cases} 0 & |x| > \Delta x/2 \\ 0,5 & |x| = \Delta x/2 \\ 1 & |x| < \Delta x/2 \end{cases} \quad (5.40)$$

Δx_{max} ist der maximale, in die AP_{BII} projizierte, optische Wegunterschied zwischen den beiden Interferometerarmen und $\hat{l}_c = l_c/(2 \sin(w))$ die in die AP_{BII} projizierte Kohärenzlänge. Der Term $e^{i\frac{2\pi}{\bar{\lambda}}2x \sin(w)}$ stellt die Phase von $\Gamma_{\bar{\lambda}}$ dar und kodiert daher den Hauptstrahlwinkel des Quellpunkts. $\sin(w)$ wirkt als Normierungsfaktor, welcher das Anwachsen des Faltungsintegrals für $w \rightarrow 0^\circ$ kompensiert. Das in Gleichung 5.39 symbolisch formulierte Faltungsintegral bestimmt die Struktur der Kohärenzfunktion und definiert somit auch die Form des Punktbildes. Abbildung 5.27 veranschaulicht den Einfluss der beiden jeweils von w abhängigen Funktionen Δx_{max} und \hat{l}_c auf $\Gamma_{\bar{\lambda}}(x)$. Hierbei zeigt Abbildung 5.27.a) das Interferenzmuster $I_{\text{IF}}(x, \Delta\zeta_{\text{IF}})$ innerhalb AP_{BII} . Es ist zu erkennen, dass der Kontrast der Interferenzstreifen aufgrund der geringen Kohärenzlänge des beispielhaft gewählten Spektrums nur in einem kleinen Teil der ausgeleuchteten Pupille größer als 0,5 ist, wobei die Halbwertsbreite der Einhüllenden durch \hat{l}_c bestimmt wird. Der Schnitt

⁴⁹ Hierbei wird vorausgesetzt, dass die optische Wegdifferenz zwischen den Interferometerarmen symmetrisch zum Abgleichspunkt abgefahren wird ($\Delta\zeta_{\text{IF}} = -\Delta\zeta_{\text{max}/2} \rightarrow +\Delta\zeta_{\text{max}/2}$).

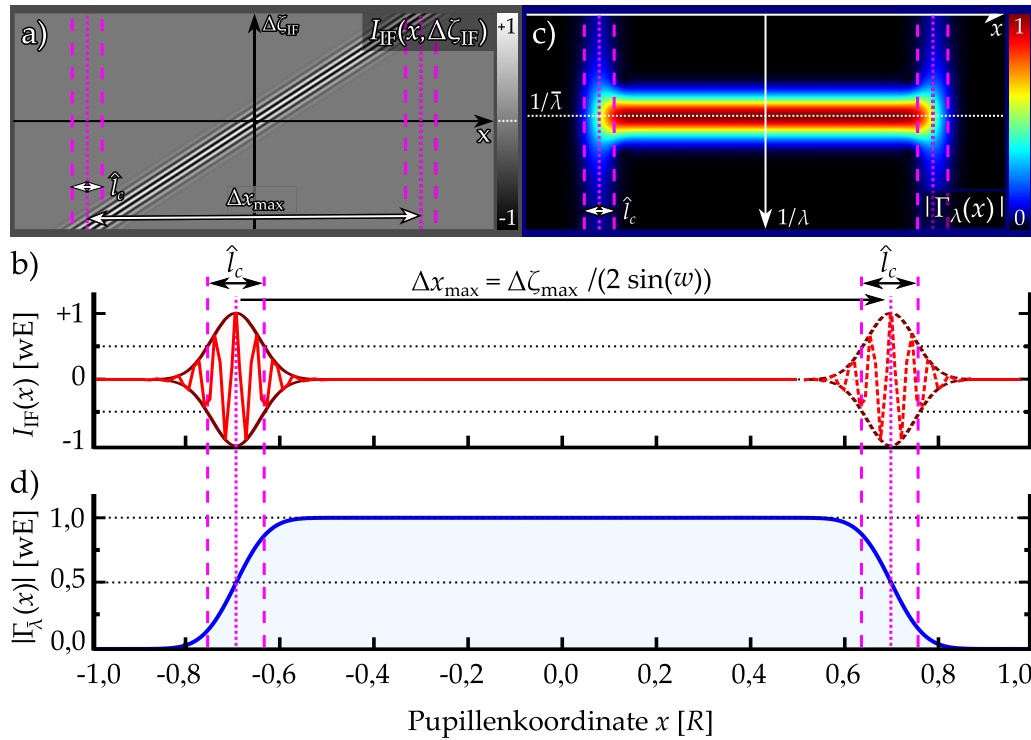


Abbildung 5.27: a) Verlauf der Interferenzstruktur I_{IF} innerhalb AP_{BII} in Abhängigkeit von x ($y = 0$ m) und $\Delta\zeta_{IF}$. b) Schnitt durch die Interferenzstruktur für $\Delta\zeta_{IF} = -\Delta\zeta_{\max}/2$ (durchgezogen) und $\Delta\zeta_{IF} = +\Delta\zeta_{\max}/2$ (gestrichelt). c) Per Fouriertransformation aus $I_{IF}(x, \Delta\zeta_{IF})$ gewonnene Kohärenzfunktion $\Gamma_\lambda(x)$. d) Normierte räumliche Kohärenzfunktion für die mittlere Wellenlänge $\bar{\lambda}$ nach Gleichung 5.39.

durch diese Interferenzstruktur ist in Abbildung 5.27.b) für $\Delta\zeta_{IF} = -\Delta\zeta_{\max}/2$ und $\Delta\zeta_{IF} = +\Delta\zeta_{\max}/2$ zu sehen. Abbildung 5.27.c) stellt den Betrag des aus $I_{IF}(x, \Delta\zeta_{IF})$ mittels Fouriertransformation entlang der $\Delta\zeta_{IF}$ -Koordinate gewonnenen $\Gamma_\lambda(x)$ dar. Während die wellenlängenabhängige Kohärenzfunktion im Zentrum der AP_{BII} korrekt wiedergegeben wird, kommt es an den Grenzen des abgefahrenen Bereichs zu einer Verwaschung. Als Folge dessen fällt ihr Betrag für $\bar{\lambda}$ zum Rand der AP_{BII} hin ab und steigt dort stattdessen für andere Wellenlängen an. Abbildung 5.27.d) zeigt das Ergebnis der durch Gleichung 5.39 beschriebenen Näherung der Kohärenzfunktion für die mittlere Wellenlänge. Die Breite des Bereichs, in welchem $|\Gamma_\lambda(x)|$ von ca. 0,12 auf rund 0,88 ansteigt, ist hierbei durch \hat{l}_c gegeben.

Aus Gleichung 5.39 wird deutlich, dass die Struktur des Betrags von $\Gamma_\lambda(x)$ durch die Quotienten $\hat{l}_c = l_c / (2 \sin(w))$ und $\Delta x_{\max} = \Delta\zeta_{\max} / (2 \sin(w))$ vollständig bestimmt ist. Jedes der Quotientenpaare $(\hat{l}_c, \Delta x_{\max})$ ist daher auch mit einer bestimmten Struktur der Punktbildverwaschungsfunktion assoziiert. Abbildung 5.28 zeigt beispielhaft vier solcher Kombinationen $(\hat{l}_c, \Delta x_{\max})$ als auch die daraus resultierenden Punktbildverwaschungsfunktionen. Kurze Kohärenzlängen bzw. große Hauptstrahlwinkel ($\hat{l}_c \ll 2R$) führen, wie in Abbildung 5.28.a) und 5.28.e) gezeigt, bei kleinen $\Delta\zeta_{\max}$ ($\Delta x_{\max} \ll 2R$) dazu, dass die Kohärenzfunktion nur eine gerin-

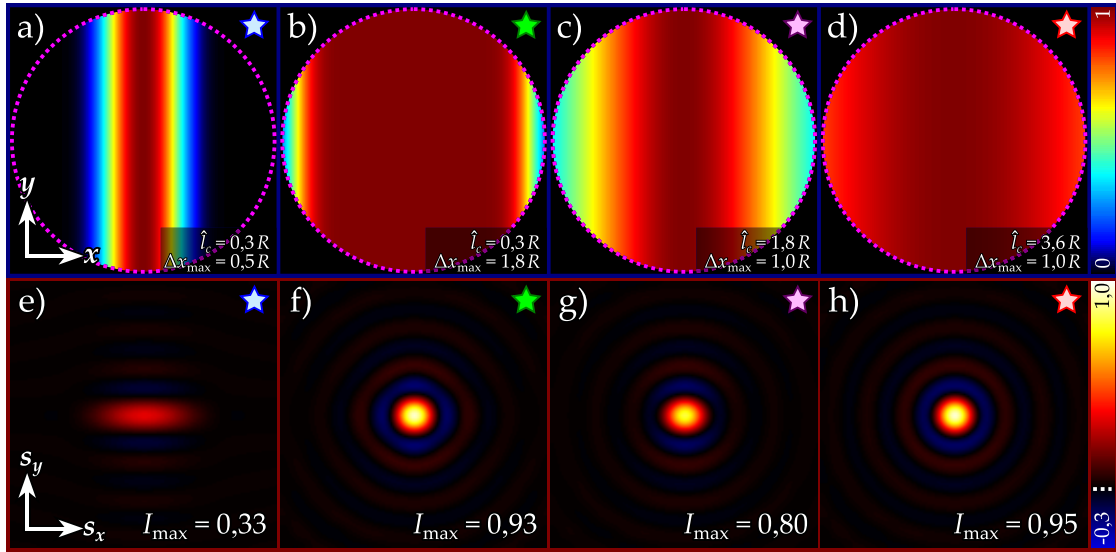


Abbildung 5.28: (a–d) Betrag der Kohärenzfunktion innerhalb der Austrittspupille (pink gestrichelt) sowie die daraus resultierenden Punktbilder (e–f). Für die Darstellung der IPSFs wurde deren Intensitätsverteilung auf die der IPSF im Zentrum des Gesichtsfeldes normiert ($w \rightarrow 0^\circ$).

ge Ausdehnung in x -Richtung hat. Daraus resultiert sowohl eine Absenkung der Intensität der IPSF als auch deren Verbreiterung in s_x -Richtung. Im allgemeinen Fall einer beliebigen Position des Lichtpunkts in der Objektebene findet diese Verbreiterung in radialer Richtung statt. Das Punktbild deformiert sich demnach zunehmend mit wachsendem Abstand zur Bildmitte. Wie aus Abbildung 5.28.b) und 5.28.f) zu erkennen ist, kann dieser Effekt durch eine Vergrößerung von $\Delta\zeta_{\max}$ und damit auch von Δx_{\max} kompensiert werden. In diesem Beispiel ist Δx_{\max} so groß, dass $|\Gamma_{\lambda}|$ trotz kleiner Kohärenzlänge über fast die gesamte AP_{BII} konstant bleibt. Dies führt zu einer nahezu rotationssymmetrischen IPSF, deren Maximum annähernd dem der IPSF in der Bildmitte ($w = 0^\circ$) entspricht. Die Abbildungen 5.28.c) und 5.28.d) stellen den Betrag der komplexen Kohärenzfunktion innerhalb der AP_{BII} bei $\Delta x_{\max} = 1,0 R$ für zwei verschiedene Werte von \hat{l}_c dar, während die Abbildungen 5.28.g) und 5.28.h) die daraus resultierenden IPSFs zeigen.

Um diejenigen Quotientenpaare zu ermitteln, für welche eine nahezu beugungsbegrenzte Abbildung möglich ist, wird auch hier das verallgemeinerte Strehl-Verhältnis \widetilde{SV} mit dem Schwellwert von 0,8 verwendet. Abbildung 5.29 stellt dafür $\widetilde{SV}(\hat{l}_c, \Delta x_{\max})$ im Bereich von $\hat{l}_c = 0 R$ bis $4 R$ sowie von $\Delta x_{\max} = 0 R$ bis $2 R$ dar. Der Wert von 0,8 entspricht hierbei der grün gepunktet eingezeichneten Isolinie. Aus deren Verlauf kann der Zusammenhang zwischen dem Hauptstrahlwinkel w_{\max} , der maximalen optischen Wegdifferenz $\Delta\zeta_{\max}$ und der Kohärenzlänge l_c bestimmt werden⁵⁰. w_{\max} bezeichnet hier den Hauptstrahlwinkel, bis zu welchem die Rekon-

⁵⁰ Zwar ist der Verlauf dieser Isolinie auch von R abhängig; da das Mikroskopobjektiv jedoch in der Regel durch die Anwendung festgelegt ist, ist R in diesem Sinne keine freie Variable.

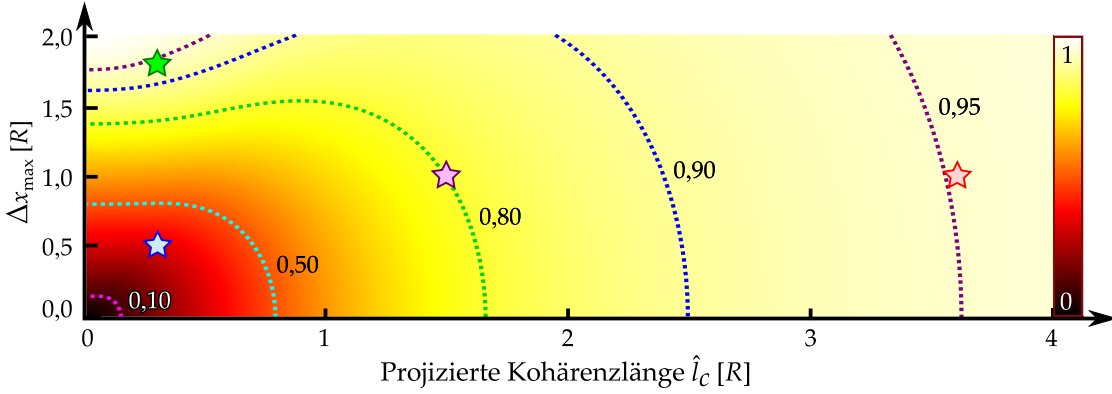


Abbildung 5.29: Abhängigkeit des Strehl-Verhältnisses \widetilde{SV} von Δx_{\max} und \hat{l}_c . Die farbig gestrichelt eingezeichneten Isolinien entsprechen den Strehl-Verhältnissen zu den jeweils angegebenen Werten. Die vier Sterne markieren die Quotientenpaare $(\hat{l}_c, \Delta x_{\max})$, welche zu den in Abbildung 5.28 gezeigten Kohärenzfunktionen bzw. Punktbildverwaschungsfunktionen gehören.

struktion als beugungsbegrenzt betrachtet werden kann. Die Isolinie kann durch

$$\frac{\Delta x_{\max}}{2R} \geq \sqrt{0,35 + 0,81 \frac{\hat{l}_c}{R} - 0,60 \left(\frac{\hat{l}_c}{R} \right)^2} \quad (5.41)$$

genähert werden. Durch Rücksubstitution ist es möglich, den Grenzwert eines der drei freien Parameter abzuschätzen, sofern die beiden anderen bekannt sind. Wird beispielsweise ein bestimmtes Gesichtsfeld, und somit der Hauptstrahlwinkel w_{\max} , gefordert, während zur Beleuchtung Licht einer Kohärenzlänge l_c eingesetzt wird, ergibt sich der notwendige optische Wegunterschied $\Delta \zeta_{\max}$ zu:

$$\Delta \zeta_{\max} \geq \sqrt{5,60 R^2 \sin^2(w_{\max}) + 6,48 l_c R \sin(w_{\max}) - 2,41 l_c^2}. \quad (5.42)$$

Durch das Umstellen von Gleichung 5.42 ist es zudem möglich, den Sinus des maximalen Hauptstrahlwinkels w_{\max} bei gegebenen l_c und $\Delta \zeta_{\max}$ zu berechnen:

$$\sin(w_{\max}) \leq -0,58 \frac{l_c}{R} + \sqrt{0,77 \left(\frac{l_c}{R} \right)^2 + 0,18 \left(\frac{\Delta \zeta_{\max}}{R} \right)^2}. \quad (5.43)$$

Die durch Gleichung 5.41 beschriebene Funktion hat ein Maximum für $\hat{l}_c > 0 R$, weswegen ein Umstellen nach der Kohärenzlänge die beiden Lösungen

$$l_c \leq 1,34 R \sin(w_{\max}) - \sqrt{4,12 R^2 \sin^2(w_{\max}) + 0,41 \Delta \zeta_{\max}^2} \quad (5.44a)$$

$$l_c \geq 1,34 R \sin(w_{\max}) + \sqrt{4,12 R^2 \sin^2(w_{\max}) + 0,41 \Delta \zeta_{\max}^2} \quad (5.44b)$$

liefert. Eine entsprechende Kurvendiskussion zeigt zudem, dass bis zu $\Delta \zeta_{\max} = 2,38 R \sin(w_{\max})$ nur die Lösung nach Gleichung 5.44a existiert. Von

den. Der maximale Hauptstrahlwinkel, für welchen ein Objektpunkt nach Gleichung 5.43 noch beugungsbegrenzt dargestellt werden kann, ist in den Abbildungen 5.30.a)–5.30.b) blau gestrichelt markiert. Für den in Abbildung 5.30.a) gezeigten Fall ($l_c = 2\text{ }\mu\text{m}$, $\Delta\zeta_{\max} = 3,8\text{ }\mu\text{m}$) beträgt w_{\max} nur $0,017^\circ$, woraus sich mit $R = 4,04\text{ mm}$ nach Gleichung 4.2 (Seite 31) ein nutzbares Gesichtsfeld $D_{\max} \approx 34\text{ }\mu\text{m}$ ergibt. Dies entspricht nur ca. 4 % des maximal möglichen Gesichtsfeldes von ca. $860\text{ }\mu\text{m}$. Anhand dieser Rekonstruktion kann die vorhergesagte Deformation der IPSF (vgl. Abbildung 5.28) durch die in radialer Richtung verzerrten Strukturen indirekt beobachtet werden. Die Stärke dieser Verzerrung nimmt erwartungsgemäß mit wachsendem Abstand zum Bildmittelpunkt zu.

Wie aus Abbildung 5.30.b) zu erkennen ist, führt eine Vergrößerung von $\Delta\zeta_{\max}$ auf $11,39\text{ }\mu\text{m}$ bei gleicher Kohärenzlänge zu einem deutlich größeren nutzbaren Gesichtsfeld. Der theoretische Wert für w_{\max} beträgt nach Gleichung 5.43 $0,057^\circ$, woraus $D_{\max} \approx 114\text{ }\mu\text{m}$ folgt. Hier fällt deutlicher als in Abbildung 5.30.a) auf, dass auch außerhalb von D_{\max} noch scheinbar scharfe Strukturen existieren. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle unterstrichen werden, dass unter den hier angenommenen Rahmenbedingungen und mit dem Schärfekriterium $\widetilde{SV} \geq 0,8$ nur eine Verbreiterung der IPSF von ca. 15 % erreicht wird. Solch ein geringer Wert führt bei der Größe der gezeigten Bilder noch nicht zu einer merklichen Verwaschung der Strukturen. Abbildung 5.30.c) zeigt die Rekonstruktion der Blende für ($l_c = 320\text{ }\mu\text{m}$, $\Delta\zeta_{\max} = 3,8\text{ }\mu\text{m}$). Aufgrund der großen Kohärenzlänge ist w_{\max} mit $1,361^\circ$ bzw. D_{\max} mit $2715\text{ }\mu\text{m}$ nun deutlich größer als das mit diesem System darstellbare Gesichtsfeld (Kapitel 4.1, Seite 30).

Um das in diesem Kapitel erstellte mathematische Modell des ortsabhängigen Punktbildes genauer zu überprüfen, wurden die in den Abbildungen 5.30.a) – 5.30.c) dargestellten Rekonstruktionen des Glasträgers und der Gesichtsfeldblende mit Simulationen auf Basis von Gleichung 5.39 verglichen. Als Ausgangspunkt hierfür diente die Rekonstruktion aus Abbildung 5.30.c). Daraus wurde ein Graustufenbild erstellt⁵¹, welches sowohl die Kontur der Gesichtsfeldblende, deutlich erkennbare Staubpartikel als auch den Helligkeitsverlauf der Beleuchtung berücksichtigt. Um die Vergleichbarkeit zwischen der Simulation und den Rekonstruktionen zu erhöhen, wurde den simulierten Bildern ein Rauschen hinzugefügt, welches dem der jeweiligen Rekonstruktionen näherungsweise entsprach. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.30.d) – 5.30.f) unter den zugehörigen Rekonstruktionen dargestellt. Da die Ausgangsdaten der Simulation aus den Messwerten erstellt wurden, ist nur ein qualitativer Vergleich mit den Rekonstruktionen möglich. Dabei zeigt sich jedoch, dass die Verwaschung der Objektdetails in Abhängigkeit vom Abstand zum Bildmittelpunkt für alle drei Bildpaare praktisch übereinstimmt.

⁵¹ Hierfür kamen verschiedene Filter- und Schwellwertoperationen zum Einsatz, um für die Simulation ein rauschfreies Ausgangsbild mit scharfen Kanten zu erstellen.

5.8 Bildrauschen

Eine bisher noch nicht diskutierte Problematik des vorgestellten Mikroskopieverfahrens ist das Bildrauschen. Bei der klassischen Abbildung wird die Objektstruktur direkt auf den Detektor abgebildet. Das Rauschen des aufgenommenen Bildes entspricht folglich dem der vom Detektor aufgenommenen und digitalisierten Messwerte. Die Charakteristika der verschiedenen Rauschquellen finden sich demnach direkt in den Bildern wieder. Als Hauptrauschquellen für gebräuchliche Detektoren wie CCD- und CMOS-Kameras, oder auch Photomultiplier und Avalanche-Photodioden, wären beispielsweise neben dem Photonenrauschen das Verstärker- und Dunkelstromrauschen sowie das Digitalisierungsrauschen zu nennen [99, 151, 152].

Anders verhält es sich bei dem hier vorgestellten Verfahren. Aus den digitalisierten Messwerten (Interferogrammen) wird zuerst die komplexe räumliche Kohärenzfunktion bestimmt und im Anschluss daran das Bild mittels Fouriertransformation rekonstruiert. Es muss demnach untersucht werden, wie sich das Rauschsignal aus den aufgenommenen Interferogrammen durch den Rekonstruktionsprozess hindurch in das Bild fortsetzt. Im Bezug auf das *coherence imaging* wurde das Bildrauschen in der Literatur bereits mehrfach unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht [35, 153–157]. Diese Überlegungen werden im Folgenden auf das Rauschverhalten eines Weitfeldbildinversionsmikroskops übertragen, wobei im Wesentlichen auf die Untersuchungen von Ribak [155] Bezug genommen wird. Darin wird davon ausgegangen, dass das Photonenrauschen die dominante Rauschquelle ist und andere Einflüsse vernachlässigbar sind. Dieser Ansatz ist darin begründet, dass durch spezielle Sensoren und deren Kühlung der Einfluss anderer Rauschquellen so weit reduziert wird, dass das Photonenrauschen die vorrangige Rauschquelle ist. Die von Ribak hergeleiteten Zusammenhänge werden anschließend mithilfe einer Messreihe überprüft.

5.8.1 Anforderung an den Detektor

Bevor jedoch das Rauschverhalten des bildinvertierenden Mikroskops diskutiert wird, soll auf eine grundlegende Anforderung an den Detektor eingegangen werden. Diese ergibt sich bereits aus dem in Kapitel 5.1 erläuterten Zusammenhang zwischen Objektstruktur und Interferenzmuster. Leuchtende Objektpunkte führen zu Interferenzstreifenmustern in der AP_{BII} , deren Intensitäten sich im Fall räumlicher Inkohärenz aufsummieren. Die Periode und die Orientierung der Interferenzstreifen sind hierbei charakteristisch für die jeweiligen Quellpunkte. Aus Symmetriegründen hat im abgeglichenen Interferometer ($\Delta\zeta = 0 \mu\text{m}$) jedoch jeder Streifen auf der Inversionsachse ein Interferenzminimum (destruktiver Ausgang)

bzw. ein Interferenzmaximum (konstruktiver Ausgang). Am konstruktiven Interferometerausgang kommt es dort dadurch zu einem Interferenzpeak⁵², zu welchem alle Quellpunkte beitragen. Da jeder Interferenzstreifen am destruktiven Ausgang ein Minimum hat, ist direkt auf der Inversionsachse theoretisch keine⁵³ Intensität messbar. Durch die inkohärente Summation aller Interferenzstreifen bildet sich mit einer wachsenden Zahl von über das Bildfeld verteilten Objektpunkten außerhalb des Zentrums ein Gleichlichtanteil aus, welcher die halbe Intensität des zentralen Interferenzpeaks am konstruktiven Ausgang aufweist. Dadurch verringert sich die Modulation der Interferenzstruktur außerhalb des zentralen Maximums.

Das in Abbildung 5.31 gezeigte Interferogramm wurde am konstruktiven Ausgang des BII aufgenommen und soll diesen Sachverhalt verbildlichen. Um eine Sättigung des Sensors im Zentrum der AP_{BII} zu verhindern und gleichzeitig die gering modulierten Interferenzstrukturen außerhalb darstellen zu können, wird ein Sensor mit hohem Dynamikumfang⁵⁴ und hohem Tonwertumfang⁵⁵ benötigt.

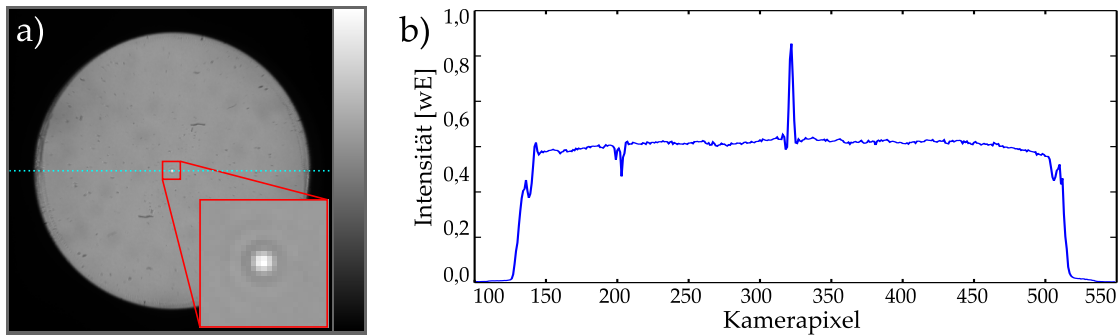


Abbildung 5.31: a) Intensitätsverteilung in der AP_{BII} , welche durch die ausgeleuchtete Gesichtsfeldblende hervorgerufen wurde (vgl. Abbildung 5.30.a). Die Intensität des zentralen Peaks ist sehr viel größer als die Intensität der Strukturen außerhalb des Zentrums. Das SRV dieser Nebenmaxima und -minima ist demnach stark vermindert. b) Schnitt durch den in a) türkis gestrichelten Bereich.

5.8.2 Signal-Rausch-Verhältnis

Als Maß für das Rauschen von Messwerten wird häufig das Signal-Rausch-Verhältnis verwendet. Es bezeichnet im Allgemeinen das Verhältnis der mittleren Leistung eines Nutzsignals zu dessen mittlerer Rauschleistung [151, 160]. Im Kontext der (digitalen) Bildverarbeitung entspricht es dem Verhältnis des mittleren

⁵² Der Interferenzpeak repräsentiert die nullte Ordnung im Fourierspektrum der Intensitätsverteilung in der Objektebene und spiegelt daher die aufintegrierte Intensität der beobachteten Szene wider. $\tilde{I}(\mathbf{v}) = \iint_{-\infty}^{+\infty} I(\mathbf{r}) \exp(-2\pi\mathbf{v}\mathbf{r}) d\mathbf{r} \rightarrow \tilde{I}(\mathbf{0}) = \iint_{-\infty}^{+\infty} I(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$

⁵³ Im idealisierten Fall identischer optischer Wege in beiden Interferometerarmen und ohne Aberrationen innerhalb des Interferometers.

⁵⁴ Der Dynamikumfang eines Sensors ist durch das Verhältnis der maximalen Anzahl der pro Pixel messbaren Photoelektronen zu dessen Grundrauschen definiert [158].

⁵⁵ Der Tonwertumfang gibt die maximale Anzahl von möglichen Pixelwerten an [159].

Grauwerts \bar{I} eines Bildpixels zu dessen Rauschen:

$$\text{SRV} = \frac{\bar{I}}{\sigma_R}. \quad (5.45)$$

Sowohl $\bar{I} = \frac{1}{J_B} \sum_{j=1}^{J_B} I_j$ als auch die Standardabweichung des Grauwerts $\sigma_R = \sqrt{\frac{1}{J_B} \sum_{j=1}^{J_B} (I_j - \bar{I})^2}$ sind hierbei auf ein Ensemble von J_B Einzelbildern bezogen, wobei I_j dem Grauwert des betrachteten Pixels im j ten Bild entspricht. Existieren pro Bild jedoch mehrere Pixel, von denen bekannt ist, dass sie denselben mittleren Grauwert besitzen (zum Beispiel aufgrund homogen ausgeleuchteter Flächen), kann das SRV in diesem Bereich näherungsweise durch den Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Pixel bestimmt werden. In diesem Fall genügt daher eine Aufnahme zur Ermittlung des SRV.

Mathematisch betrachtet ähnelt der Zusammenhang zwischen der Kohärenzfunktion und dem rekonstruierten Bild in der Weitfeldbildinversionsmikroskopie dem zwischen dem Interferogramm und dem Spektrum in der Fourier-Spektroskopie. In beiden Fällen entspricht das Rauschen in der Rekonstruktion (Bild der Objektstruktur bzw. Spektrum der Probe) der Fouriertransformation des Rauschens im Ausgangssignal (komplexe Kohärenzfunktion bzw. Interferogramm) [99, 153, 155, 161, 162]. Unter Anwendung des Satzes von Parseval [55] erhält Ribak daher den folgenden Zusammenhang zwischen dem mittleren Signal-Rausch-Verhältnis im rekonstruierten interferometrischen Bild SRV_R und dem der komplexen Kohärenzfunktion SRV_Γ :

$$\text{SRV}_R = \frac{\sqrt{J_{\text{px}}}}{J_{\text{OP}}} \text{SRV}_\Gamma. \quad (5.46)$$

Der Ansatz von Ribak, wie auch der anderer Autoren [35, 153, 156], liefert somit nur eine Aussage über das mittlere Rauschen innerhalb des rekonstruierten Bildes. Hierbei stellt J_{px} die Anzahl der Detektorelemente (Pixel) dar, mit welchen die Intensitätsverteilung in der AP_{BII} digitalisiert wird, während J_{OP} die Zahl der auflösbaren Objektpunkte repräsentiert. J_{OP} ergibt sich hierbei aus dem Verhältnis der Fläche des ausgeleuchteten bzw. selbstleuchtenden Gesichtsfeldes F_{IF} zur Fläche des Punktbildes und kann mithilfe von [163] folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$J_{\text{OP}} = 16 \frac{\text{NA}^2}{\lambda^2} F_{\text{IF}}. \quad (5.47)$$

Mit der in Kapitel 4.1 durchgeführten Herleitung lässt sich die Fläche eines vollständig ausgeleuchteten Gesichtsfeldes $F_{\text{IF,max}}$ wie folgt durch J_{px} ausdrücken:

$$F_{\text{IF,max}} = \frac{\lambda^2 J_{\text{px}}}{16 \text{NA}^2}. \quad (5.48)$$

Durch das Einsetzen von Gleichung 5.48 in Gleichung 5.47 wird damit deutlich, dass die maximale Anzahl auflösbarer Objektpunkte der Zahl der Detektorelemente J_{px} entspricht.

Dominiert das Photonenrauschen, ergibt sich das mittlere Rauschen eines einzelnen Interferogramms zu $\text{SRV}_{\text{IF}} = \sqrt{J_e/J_{\text{px}}}$ [155]. J_e stellt hierbei die Gesamtzahl der durch die J_{px} Detektorelemente registrierten Photoelektronen dar. Die mittlere Anzahl der Photoelektronen pro Detektorelement wird im Folgenden mit $j_e = J_e/J_{\text{px}}$ bezeichnet. Auf welche Art und Weise sich das Rauschen der J Einzelinterferogramme in die komplexe Kohärenzfunktion fortpflanzt, hängt vom angewendeten Verfahren zu deren Bestimmung ab. Beim linearen Phasenschritt-Verfahren (quasi-monochromatischer Fall, Abschnitt 3.3.1, Seite 24) ergibt sich das Signal-Rausch-Verhältnis SRV_{Γ} der komplexen Kohärenzfunktion aus dem Rauschen SRV_{IF} der Einzelinterferogramme und einem Multiplikator Q , welcher von der Anzahl J der Interferogramme und der Größe der Phasenschritte $\delta\phi$ abhängt [164]. Bei günstig gewählten $\delta\phi$ kann $\text{SRV}_{\Gamma} > \text{SRV}_{\text{IF}}$ ($Q > 1$) erreicht werden. So ist es unter Verwendung des Vier-Schritt-Carré-Algorithmus beispielsweise möglich, dass das SRV_{Γ} viermal so groß ist wie das SRV_{IF} der Einzelinterferogramme [89]. Wird breitbandiges Licht verwendet, bietet sich die Fourier-Spektroskopie-Methode zur Ermittlung der komplexen Kohärenzfunktion an. Wie auch in der klassischen Fourier-Spektroskopie [99, 162] hängt Q in diesem Fall von der konkreten Struktur des Spektrums sowie der maximalen optischen Wegdifferenz ab. Kommt sehr breitbandiges Licht zum Einsatz, verschlechtert sich das SRV_{Γ} beispielsweise mit wachsender optischer Wegdifferenz⁵⁶. In beiden Fällen ist das Signal-Rausch-Verhältnis für jedes Detektorelement jedoch proportional zur Wurzel der registrierten Photoelektronen. Das mittlere SRV der Kohärenzfunktion kann daher sowohl für die linearen Phasenschritt-Verfahren als auch für die Fourier-Spektroskopie-Methode nach

$$\text{SRV}_{\Gamma} = Q \sqrt{\frac{J_e}{J_{\text{px}}}} \quad \text{bzw.} \quad \text{SRV}_{\Gamma} = Q \sqrt{j_e} \quad (5.49)$$

angegeben werden. Mithilfe der Gleichungen 5.46–5.49 ergibt sich SRV_{R} zu:

$$\text{SRV}_{\text{R}} = Q \frac{\sqrt{J_e}}{J_{\text{OP}}} \quad \text{bzw.} \quad \text{SRV}_{\text{R}} = Q \frac{\sqrt{J_{\text{px}} j_e}}{J_{\text{OP}}}. \quad (5.50)$$

Während das SRV im Fall der klassischen Abbildung auf den Detektor unabhängig von der Anzahl der auflösbaren Bildpunkte ist, sinkt das SRV_{R} des interferometrischen Systems umgekehrt proportional zur Zahl der auflösbaren Objektpunkte.

⁵⁶ Bei konstanter Schrittweite $\Delta\zeta_{\text{IF}}$ bedeutet eine große optische Wegdifferenz $\Delta\zeta_{\text{max}}$ eine Vergrößerung von J . Das Signal (Interferenzen) ist bei breitbandigem Licht daher nur in einem kleinen Bereich um den Abgleichspunkt herum größer als das Rauschen. Die Teile des Interferogramms, welche bei deutlich größeren optischen Wegdifferenzen aufgenommen wurden, tragen demnach kaum zum Signal bei, stellen aber dennoch eine Rauschquelle dar.

Dies bedeutet, dass das Signal-Rausch-Verhältnis eines Weitfeldbildinversionsmikroskops um den Faktor $\frac{\sqrt{2}J_{OP}}{Q\sqrt{J_{px}}}$ schlechter ist als das eines konventionellen Weitfeldmikroskops unter identischen Bedingungen⁵⁷.

Im Gegensatz zu der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten CCD-Kamera (*Allied Vision Technologies GmbH*, Pike F-032) können spezielle Kameras je nach Modell mehrere hunderttausend Photoelektronen pro Pixel nachweisen [165, 166]. Für das folgende Beispiel wird von einem Sensor mit einer Größe von 512×512 Pixeln ($J_{px} = 512^2$) und einer Elektronenspeicherkapazität (*Full Well Capacity*, FWC) von 200 000 Photoelektronen pro Pixel ausgegangen. Damit können nach Gleichung 5.47 und 5.48 bis zu 512^2 Objektpunkte beugungsbegrenzt dargestellt werden. Zur Abschätzung des SRV im rekonstruierten Bild wird nun davon ausgegangen, dass das Gesichtsfeld vollständig ausgeleuchtet ist ($J_{OP} = 512^2$). Wird die komplexe Kohärenzfunktion mithilfe eines linearen Phasenschritt-Algorithmus aus drei Einzelinterferogrammen gewonnen, ist es möglich, einen Multiplikator von $Q = 3$ zu erreichen [89]. Berücksichtigt man, dass aufgrund des zentralen Interfe-

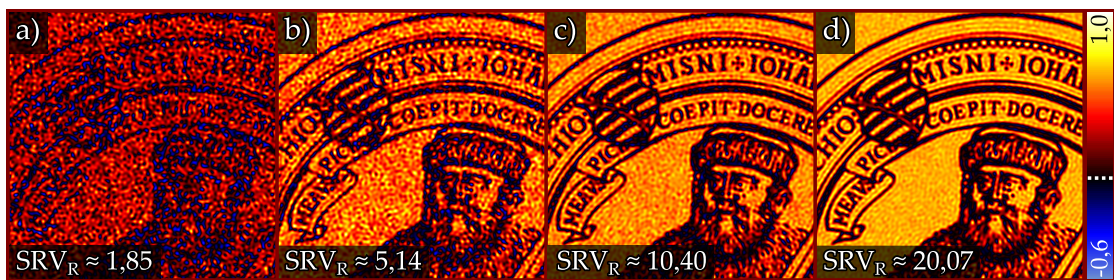


Abbildung 5.32: Einfluss des Signal-Rausch-Verhaltens der interferometrischen Rekonstruktion auf die Bildqualität. Es ist jeweils derselbe Ausschnitt aus dem Logo der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit verschiedenem SRV_R dargestellt.

renzpeaks jedes Pixel im Mittel nur die Hälfte der maximal möglichen Photoelektronen nachweisen kann ($j_e = 100\,000$), ergibt sich ein Signal-Rausch-Verhältnis von $SRV_R \approx 1,85$.

Zwar sind die Anforderungen an das SRV eines abbildenden Verfahrens abhängig vom Anwendungsbereich; Abbildung 5.32.a) lässt jedoch vermuten, dass ein Wert von 1,85 für einen Großteil möglicher Anwendungen zu niedrig ist. Das Rauschen ist in diesem Fall so stark, dass kaum zwischen Objektdetails und dem Rauschen differenziert werden kann. Wie die berechneten Bilder aus Abbildung 5.32 beispielhaft zeigen, ist es erst ab einem SRV_R von ca. 10 möglich, die feinen Strukturen vom Rauschen zu unterscheiden. Auf Basis von Gleichung 5.50 bieten sich verschiedene Strategien an, um das SRV_R zu verbessern.

⁵⁷ Der Faktor $\sqrt{2}$ berücksichtigt, dass aufgrund des zentralen Interferenzpeaks der Großteil der Kamerapixel nur die Hälfte der maximal möglichen Photoelektronen nachweisen kann.

Registrierung von mehr Photoelektronen (j_e)

Wird die Anzahl der detektierten Photonen um den Faktor p_e erhöht, verbessert sich das SRV_R um den Faktor $\sqrt{p_e}$. Sofern die Speicherkapazität von Photoelektronen pro Detektorpixel nicht überschritten wird, kann dies beispielsweise durch eine Vergrößerung der Aufnahmezeit erreicht werden. Ist die maximale FWC bereits ausgeschöpft, muss entweder ein anderer Sensor verwendet werden oder es müssen die Aufnahmen vieler identischer Interferogramme aufsummiert werden.

Höhere Anzahl an Kamerapixeln (J_{px})

Wird die AP_{BII} auf eine größere Anzahl von Pixeln desselben Detektors abgebildet, verbessert sich das SRV_R ebenfalls. Erhöht sich die Zahl der Pixel um den Faktor p_{px} , verbessert sich das SRV_R um den Faktor $\sqrt{p_{px}}$.

Optimierung des Berechnungsalgorithmus (Q)

Eine weitere Möglichkeit, das SRV_R zu optimieren, stellt die Methode dar, mit welcher Γ aus den aufgenommenen Interferogrammen berechnet wird. Bei einem linearen Phasenschrittverfahren entsprechen die Zahl der Phasenschritte und die Schrittweite beispielsweise den Optimierungsparametern. Hierbei muss zwischen der Anzahl der Phasenschritte (steigende Aufnahmezeit) und der Verbesserung des SRV_R abgewogen werden. Die Verwendung von 27 Interferogrammen führt zwar, verglichen mit drei Interferogrammen, zu einer Steigerung des SRV_R um den Faktor 3 [164], verlängert die Aufnahmezeit allerdings um mindestens das Neunfache. Kommt die Fourier-Spektroskopie-Methode zum Einsatz, muss ein Kompromiss zwischen der spektralen Auflösung und dem SRV_R getroffen werden. Je kleiner die maximale optische Wegdifferenz ist, desto besser ist das SRV_{IF} , aber umso schlechter wird die spektrale Auflösung und umgekehrt.

Reduzierung der auflösbaren Objektpunkte (J_{OP})

Die Anzahl der leuchtenden bzw. streuenden, auflösbaren Objektpunkte geht invers in Gleichung 5.50 ein. Eine Halbierung dieser führt somit zu einer Verdoppelung des SRV_R . Daher kann bereits die Art der Beleuchtung und die Struktur des Objekts einen entscheidenden Einfluss auf das SRV_R haben. Ist die Probe beispielsweise weitgehend durchsichtig und besteht nur aus sehr wenigen streuenden Punkten, wäre eine Durchlichtbeleuchtung ungünstig. In diesem Fall ist die Anzahl der hellen Objektpunkte aufgrund der durchscheinenden Beleuchtung sehr viel größer als die der streuenden und somit dunklen Objektpunkte. Ist das Objekt hingegen sehr dicht und transmittiert weniger Licht, als es streuen würde, wäre eine Durchlichtbeleuchtung in Bezug auf das SRV_R sinnvoll. Falls möglich, sollte daher immer die Beleuchtung gewählt werden, welche zur geringstmöglichen Anzahl heller Objektpunkte führt. Abbildung 5.33 verdeutlicht diesen Effekt am Beispiel einer berechneten Objektstruktur. Genügen diese Maßnahmen nicht, stellen auch die Einschränkung des Gesichtsfeldes oder die Verringerung der numerischen Apertur Möglichkeiten zur Steigerung des SRV_R dar.

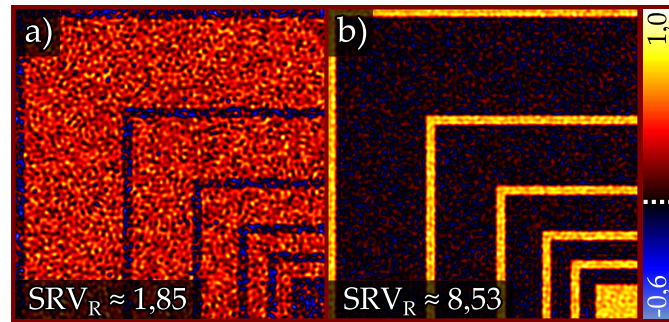


Abbildung 5.33: Berechnete Abbildung einer überwiegend streuenden Teststruktur. a) Im Fall der Auflichtbeleuchtung existieren aufgrund der großen streuenden Fläche viele helle, auflösbare Objekte, wodurch unter den simulierten Bedingungen nur ein SRV_R von ca. 1,85 erreicht wird. b) Wird stattdessen eine Durchlichtbeleuchtung eingesetzt, führt die identische Struktur zu deutlich weniger auflösbaren Lichtpunkten und somit zu einem verbesserten SRV_R von ca. 8,53.

Um den durch Gleichung 5.50 vorhergesagten Zusammenhang zwischen der Anzahl der auflösbaren Objektpunkte und dem SRV_R zu überprüfen, wurden Aufnahmen der leeren Gesichtsfeldblende bei neun verschiedenen Öffnungsdurchmessern gemacht. Zur Beleuchtung kam die bereits in Kapitel 5.6.3 (Seite 76) verwendete Halogenlampe ohne Filter zum Einsatz. Aufgrund der geringen Kohärenzlänge von nur ca. $2\,\mu\text{m}$ wurden jeweils 126 Einzelinterferogramme über eine optische Wegdifferenz von $11,39\,\mu\text{m}$ aufgenommen. Da die Firma *Allied Vision Technologies GmbH* keine Angaben zur FWC der verwendeten Pike F-032 Kamera macht [167], ist ein Vergleich mit theoretischen SRV -Werten an dieser Stelle nicht möglich. Aufgrund der geringen Pixelgröße von $7,4\,\mu\text{m} \times 7,4\,\mu\text{m}$ und des beobachteten Rauschverhaltens kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die FWC deutlich unter 100 000 Photoelektronen liegt. Daher wurde die HighSNR-Funktion der Kamera für alle folgenden Aufnahmen mit einem Wert von 128 genutzt. Dadurch war es möglich, auch bei vollständig geöffneter Gesichtsfeldblende ein zur Rekonstruktion hinreichend gutes SRV_R zu erhalten. Die Integrationszeit der Kamera wurde für jeden Gesichtsfeldblendendurchmesser so gewählt, dass der zentrale Interferenzpeak einen Grauwert von $(54\,859 \pm 1404)$ ⁵⁸ besaß. Die mittlere Anzahl von registrierten Photoelektronen pro Kamerapixel j_e entsprach daher vermutlich $(84 \pm 2)\%$ der maximalen FWC. Die Berechnung der komplexen Kohärenzfunktion erfolgte, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, mithilfe der Fourier-Spektroskopie-Methode, wobei die Rekonstruktion der Gesichtsfeldblende beim spektralen Maximum von 670 nm durchgeführt wurde.

Die Abbildungen 5.34.a) – 5.34.d) zeigen die Rekonstruktion der Gesichtsfeldblende für vier verschiedene Öffnungsdurchmesser D_B . In dem vergrößert darge-

⁵⁸ Im 14-bit-Modus der verwendeten CCD-Kamera wurden die Bildwerte auf 16-bit hochgerechnet. Der größte Grauwert kann somit $2^{16} - 1 = 65535$ sein.

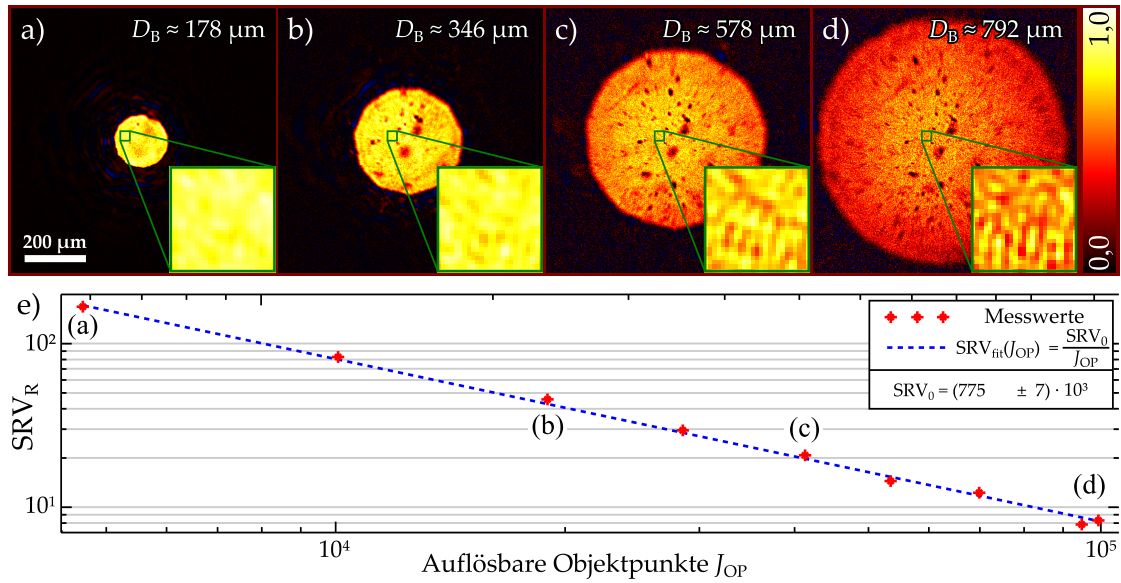


Abbildung 5.34: a)–d) Interferometrische Rekonstruktion der Gesichtsfeldblende für verschiedene Blendendurchmesser. e) Abhängigkeit des SRV_R von der Anzahl der auflösbaren Objektpunkte. Die zu a)–d) gehörenden Werte sind entsprechend markiert.

stellten Bereich ist deutlich zu erkennen, wie das SRV_R mit wachsendem Blendendurchmesser zunimmt. Da das Rauschverhalten an jedem Punkt des rekonstruierten Bildes identisch ist [155], wird das Bildrauschen im nicht ausgeleuchteten Randbereich der Szene bestimmt. Hierdurch wird ausgeschlossen, dass es zu einer Verfälschung des Rauschwertes aufgrund von Staubpartikeln oder anderen Strukturen kommt. Das Signal entsprach dem mittleren Grauwert innerhalb der verwendeten Gesichtsfeldblende. Als Anzahl der auflösbaren Objektpunkte J_{OP} wurde die Zahl der Bildpunkte verwendet, welche mindestens 30 % des maximalen Grauwerts erreichen. Durch diesen Schwellenwert wird verhindert, dass auch das Rauschen außerhalb der Blende erfasst wird oder die dunklen Bereiche innerhalb der Blende (Staubpartikel) mit eingerechnet werden. Das so berechnete SRV_R ist in Abbildung 5.34.e) über J_{OP} aufgetragen. Durch die Wahl der doppelt logarithmischen Skalierung wird deutlich, dass das SRV_R umgekehrt proportional zu J_{OP} verläuft. Mithilfe von Matlab wurden die Messwerte durch eine entsprechende Funktion angefitet. Hierbei konnte ermittelt werden, dass die Messwerte mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,999 der erwarteten $1/J_{OP}$ -Abhängigkeit aus Gleichung 5.50 (Seite 92) entsprechen. Dies bestätigt, dass das von Ribak entworfene Modell des Rauschverhaltens (Photonenrauschen) auf das hier untersuchte Weitfeldbildinversionsmikroskop angewendet werden kann.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer Ansatz untersucht, mit welchem es möglich ist, mikroskopische Objekte mit einem hohen lateralen Auflösungsvermögen und theoretisch unendlicher Schärfentiefe abzubilden. Im Gegensatz zu klassischen Techniken basiert das vorgestellte Verfahren auf der Bestimmung der räumlichen Kohärenzfunktion, aus welcher die Intensitätsverteilung der Objektstruktur rekonstruiert werden kann.

Da die komplexwertige Kohärenzfunktion keine direkt messbare physikalische Größe ist, muss sie indirekt mithilfe interferometrischer Ansätze bestimmt werden. Wie gezeigt wurde, besitzt ein sogenanntes bildinvertierendes Interferometer (BII) hierfür verschiedene Vorteile gegenüber anderen Interferometertypen. So ist beispielsweise der Abstand maximal, mit welchem zwei Punkte eines Wellenfeldes miteinander zur Interferenz gebracht werden können. Dies hat zur Folge, dass das laterale Auflösungsvermögen eines darauf basierenden Weitfeldmikroskops größer als beim Einsatz anderer Interferometer ist. Zudem entfallen bei der damit gemessenen räumlichen Kohärenzfunktion aus Symmetriegründen die quadratischen Phasenanteile, welche die Tiefeninformationen der Quellpunkte kodieren. Dieser Verlust an Phaseninformationen führt bei der Rekonstruktion der Objektstruktur zu einer theoretisch unendlichen Schärfentiefe.

Zur Aufnahme mikroskopischer Objekte mittels eines solchen Weitfeldbildinversionsmikroskops (WIIM) ist es notwendig, die räumliche Kohärenzfunktion in der Austrittspupille des Mikroskopobjektivs (MO) zu messen. Hierfür wird das Wellenfeld in der Austrittspupille durch das BII hindurch auf einen ortsauflösenden Detektor abgebildet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür eine CCD-Kamera verwendet. Das beobachtbare Interferenzmuster repräsentiert den Realteil der komplexwertigen Kohärenzfunktion, welche daraus durch Phasenschiebetechniken bestimmt werden kann. Wie bekannt ist, entspricht die so gemessene Kohärenzfunktion der Fouriertransformation der in eine Ebene projizierten räumlich inkohärenten Objektverteilung. Diese Projektion der dreidimensionalen Objektstruktur in eine Ebene ist wiederum gleichbedeutend mit einer unendlichen Schärfentiefe. Das rekonstruierte Bild lässt sich dann als Faltung der 2D-Projektion mit der interferometrischen Punktbildverwaschungsfunktion (IPSF) darstellen.

Die theoretisch unendliche Schärfentiefe ist ein besonderes Alleinstellungsmerkmal des vorgestellten Verfahrens und wurde daher ausführlich untersucht. Anhand des Miniaturmodells des Eiffelturms (ca. $800 \times 800 \times 2500 \mu\text{m}$) konnte beispielsweise demonstriert werden, dass es mithilfe des WIIMs möglich ist, dreidimensional ausgedehnte Objekte als scharfe 2D-Projektionen darzustellen. Um die Schärfentiefe quantifizieren zu können, wurde zusätzlich ein Lichtpunkt in

verschiedenen Abständen zum Mikroskopobjektiv aufgenommen. Dieser Versuch wurde sowohl mit einem einfach aufgebauten entozentrischen Mikroskopobjektiv ($NA = 0,07$) als auch mit einem deutlich komplexer konstruierten telezentrischen Mikroskopobjektiv ($NA = 0,40$) durchgeführt. Hierbei konnte eine um das 58- bzw. 123-Fache erweiterte Schärfentiefe beobachtet werden. Es zeigte sich, dass die praktisch erreichbare Schärfentiefe sowohl durch tiefenabhängige Aberrationen als auch durch die endliche Apertur des BII limitiert wird. Es ist daher zu erwarten, dass ohne entsprechende Aberrationen und durch eine Optimierung des Versuchsaufbaus eine weitere Steigerung der Schärfentiefe möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich unter paraxialen Bedingungen gearbeitet. Während diese Voraussetzung mit wachsendem Abstand von der Eintrittspupille zunehmend besser erfüllt wird, gilt sie nicht für Objektpunkte, welche sich in unmittelbarer Nähe der Eintrittspupille befinden. Es ist somit davon auszugehen, dass die Grenzen der paraxialen Näherung eine weitere Limitierung der Schärfentiefe darstellen. Dies muss in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden.

Die Position der Austrittspupille des Mikroskopobjektivs legt die Art und Weise der Projektion fest. Befindet sie sich beispielsweise in der hinteren Brennebene des Objektivs, liegt das Perspektivitätszentrum (Eintrittspupille) im Unendlichen, was zu einer verzerrungsfreien telezentrischen Projektion führt. Befindet sich die AP hingegen vor der hinteren Brennebene, kann ein tiefenabhängiger Abbildungsmaßstab beobachtet werden, welcher eine entozentrische Projektion zur Folge hat. Zum Nachweis dieses Abbildungsverhaltens wurden sowohl eine 2D-Gitterstruktur als auch ein Lichtpunkt mit festem Abstand zur optischen Achse bei verschiedenen Abständen zur Fokusebene aufgenommen. Es zeigte sich, dass der tiefenabhängige Abbildungsmaßstab des entozentrischen Mikroskopobjektivs mit einer relativen Abweichung von nur 0,1 % dem theoretischen Verlauf entsprach. Im Fall des telezentrischen Objektivs wurde ein konstanter Abbildungsmaßstab erwartet, welcher mit einer ähnlich niedrigen relativen Abweichung von 0,4 % bestätigt wurde.

Die Modulationsübertragungsfunktion eines Weitfeldbildinversionsmikroskops entspricht einer Kreisscheibenfunktion mit derselben Grenzfrequenz wie die eines vergleichbaren konventionellen Weitfeldmikroskops. Da die Ortsfrequenzen bis zur Grenzfrequenz mit einem Kontrast von 1 übertragen werden, ist die interferometrische Punktbildverwaschungsfunktion deutlich schmaler als die Punktbildverwaschungsfunktion (PSF) eines klassischen Systems. Dies führt zu einer verbesserten Zweipunktauflösung und zu kontrastreicherer Bildern. Um dieses Abbildungsverhalten zu überprüfen, wurde die IPSF aufgenommen und mit dem theoretischen Modell verglichen. Ihre Halbwertsbreite reduziert sich im Vergleich zur klassischen PSF zum Beispiel um 31 %, was einer Abweichung von nur 1 % zum theoretisch vorhergesagten Wert entspricht. Bezogen auf die Zweipunktauflösung konnte zudem eine Steigerung von 23 % nachgewiesen werden.

Die Messung der räumlichen Kohärenzfunktion mithilfe eines BII bietet einen weiteren Vorteil, welcher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden konnte. Durch Phasenobjekte verursachte Aberrationen führen zu einer Deformation des Wellenfeldes in der Austrittspupille des Mikroskopobjektivs. Diese Phasenstörungen können auch die Phase der komplexwertigen Kohärenzfunktion beeinflussen. Aus Symmetriegründen gilt dies jedoch nicht für zur Inversionsachse symmetrische Aberrationen, weswegen diese die Abbildungsqualität des rekonstruierten Bildes nicht stören. Verbliebene punktsymmetrische Abbildungsfehler können durch eine Referenzmessung bestimmt werden, wodurch eine numerische Aberrationskorrektur möglich wird. Dies konnte anhand einer Gitterstruktur demonstriert werden, welche sich hinter einem Phasenobjekt befand. Dabei wurden Wellenfrontfehler mit einem PV-Wert von $6,46 \lambda$ numerisch nahezu vollständig korrigiert.

Neben quasi-monochromatischem Licht kann das Weitfeldbildinversionsmikroskop auch mit breitbandigem Licht betrieben werden. In diesem Fall ist es möglich, das BII wie ein Fourier-Spektrometer zu verwenden. Das Resultat sind dann mehrere räumliche Kohärenzfunktionen, welche verschiedenen Wellenlängen zugeordnet werden können. Mit diesem Ansatz ist es möglich, Objektstrukturen spektral aufgelöst zu rekonstruieren. Das Funktionsprinzip wurde mit einer Struktur aus vier verschiedenfarbigen Objekten überprüft. Es zeigte sich jedoch, dass die IPSF im polychromatischen Fall ortsabhängig wird, falls der im Interferometer abgefahrte optische Wegunterschied zu gering ist. Für diese Eigenschaft des WIIMs konnte im Rahmen dieser Arbeit ein mathematisches Modell erstellt werden, welches die gemachten Beobachtungen vollständig erklärt.

Auch in Bezug auf das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) unterscheidet sich das hier vorgestellte Verfahren deutlich von dem eines konventionellen Weitfeldmikroskops. Das SRV ist sowohl von der Anzahl der auflösbaren Objektpunkte als auch von der Zahl der Detektorelemente abhängig. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurde eine Messreihe durchgeführt, welche bestätigt, dass sich das SRV mit zunehmender Zahl von Objektpunkten verschlechtert. Es muss daher gegebenenfalls ein Kompromiss zwischen dem SRV, der Größe des Gesichtsfeldes, der Auflösung und der Art der Beleuchtung getroffen werden. Zur Untersuchung entsprechender Ansätze sind jedoch weiterführende Versuche notwendig.

Während die Optimierung des Laboraufbaus, die Untersuchung anderer Interferometertypen oder die Kombination des BII mit einem kommerziellen Mikroskop experimentelle Problemstellungen für zukünftige Arbeiten darstellen, existieren auch noch offene theoretische Fragen. Hier wäre vor allem die Erweiterung des mathematischen Modells auf hohe numerische Aperturen zu nennen sowie die Korrektur ortsabhängiger Aberrationen auf Basis mehrerer Referenzmessungen oder durch geeignete Algorithmen.

Anhang A

Herleitung zur räumlichen Kohärenzfunktion in der hinteren Brennebene einer dünnen Linse

Wird die räumliche Kohärenzfunktion Γ_f in der hinteren Brennebene eines Mikroskopobjektivs mithilfe eines bildinvertierenden Interferometers (BII) gemessen, ist sie unabhängig von der Entfernung z der inkohärenten Intensitätsverteilung I_O von der Eintrittspupille. Im Folgenden wird dies am Beispiel einer einfachen Linse gezeigt. Der Sachverhalt wird von Abbildung A.1 veranschaulicht.

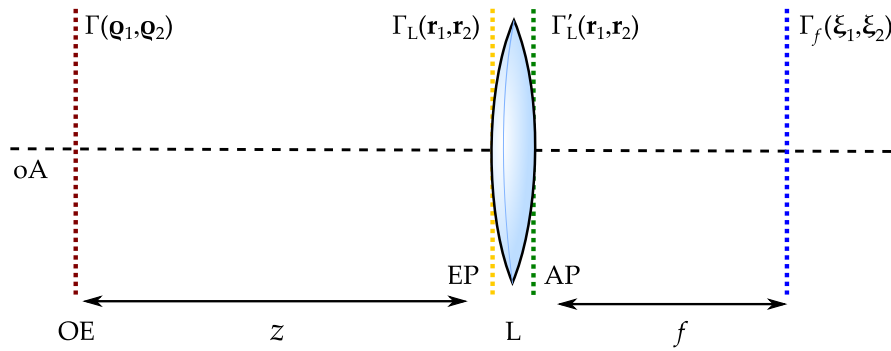


Abbildung A.1: Schematische Darstellung der Ausbreitung der Kohärenzfunktion aus der Objektebene in die hintere Brennebene einer dünnen Linse. (AP – Austrittspupille, EP – Eintrittspupille, L – Linse, OE – Objektebene, Q – Lichtquelle)

Die räumliche Kohärenzfunktion Γ_L direkt vor der Linse lässt sich durch die Freiraumausbreitung der Kohärenzfunktion Γ aus der Objektebene um den Abstand z berechnen:

$$\Gamma_L(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \frac{1}{(\lambda z)^2} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \Gamma(\boldsymbol{\rho}_1, \boldsymbol{\rho}_2) \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda z} (\mathbf{r}_2 - \boldsymbol{\rho}_2)^2\right) \times \exp\left(-i \frac{\pi}{\lambda z} (\mathbf{r}_1 - \boldsymbol{\rho}_1)^2\right) d\boldsymbol{\rho}_1 d\boldsymbol{\rho}_2. \quad (\text{A.1})$$

Die hier gewählte Darstellung ist äquivalent zu der Formulierung in Gleichung 2.31 (Abschnitt 2.3.3, Seite 15). Die Exponentialfunktionen wurden jedoch so zusammengefasst, dass deutlich wird, dass die Freiraumausbreitung einer doppelten Faltung mit den Freiraumimpulsantworten h und h^* entspricht:

$$\Gamma_L(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \otimes_{\mathbf{r}_1} h^*(\mathbf{r}_1, z) \otimes_{\mathbf{r}_2} h(\mathbf{r}_2, z) \quad (\text{A.2})$$

$$h(\mathbf{r}, z) = \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} z\right) \frac{\exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} \mathbf{r}^2\right)}{i \lambda z}. \quad (\text{A.3})$$

Der Index des Faltungsoperators \otimes deutet hierbei an, über welche Koordinaten

das Faltungsintegral ausgeführt wird. Die räumliche Kohärenzfunktion Γ'_L direkt hinter der Linse ergibt sich nach Gleichung 2.36 (Abschnitt 2.3.3, Seite 16) zu:

$$\Gamma'_L(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \Gamma_L(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda f} (\mathbf{r}_1^2 - \mathbf{r}_2^2)\right). \quad (\text{A.4})$$

Hierbei wurde eine unendliche Ausdehnung der Linse angenommen. Diese Annahme ist legitim, wenn die Aperturblende \mathcal{P} des optischen Systems nicht in der Ebene der Linse liegt [56]. Durch eine weitere Propagation kann aus Γ'_L die räumliche Kohärenzfunktion Γ_f in der hinteren Brennebene der Linse berechnet werden:

$$\Gamma_f(\xi_1, \xi_2) = \Gamma'_L(\xi_1, \xi_2) \otimes_{\xi_1} h^*(\xi_1, f) \otimes_{\xi_2} h(\xi_2, f) \quad (\text{A.5})$$

$$= \frac{\exp\left(i \frac{\pi}{\lambda f} (\xi_2^2 - \xi_1^2)\right)}{(\lambda f)^2} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \Gamma_L(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda f} \mathbf{r}_2 \xi_2\right) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f} \mathbf{r}_1 \xi_1\right) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2. \quad (\text{A.6})$$

Aus Gleichung A.6 wird deutlich, dass Γ_f der vierdimensionalen Fouriertransformation ($\mathcal{F}\{\cdot\}$) von Γ_L entspricht. Aufgrund des Faltungstheorems [56] lässt sich dieses Fourierintegral als Produkt von drei Fouriertransformationen schreiben:

$$\Gamma_f(\xi_1, \xi_2) = \frac{\exp\left(i \frac{\pi}{\lambda f} (\xi_2^2 - \xi_1^2)\right)}{(\lambda f)^2} \mathcal{F}\{\Gamma_L\}\left(\frac{\xi_1}{\lambda f}, \frac{\xi_2}{\lambda f}\right) \quad (\text{A.7})$$

$$= \frac{\exp\left(i \frac{\pi}{\lambda f} (\xi_2^2 - \xi_1^2)\right)}{(\lambda f)^2} \mathcal{F}\{\Gamma\}\left(\frac{\xi_1}{\lambda f}, \frac{\xi_2}{\lambda f}\right) \mathcal{F}\{h^*\}\left(\frac{\xi_1}{\lambda f}\right) \mathcal{F}\{h\}\left(\frac{\xi_2}{\lambda f}\right). \quad (\text{A.8})$$

Wird die Brennebene durch ein BII auf den Detektor abgebildet, gilt $\xi_2 = -\xi_1$. Aus Gleichung A.8 folgt somit:

$$\begin{aligned} \Gamma'_f(2\xi_2) &= \frac{1}{(\lambda f)^2} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \Gamma(\rho_1, \rho_2) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f} \rho_2 \xi_2\right) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f} \rho_1 \xi_2\right) d\rho_1 d\rho_2 \\ &\quad \times \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda} z\right) \frac{\exp\left(-i \frac{\pi}{\lambda z} \rho_1^2\right)}{-i \lambda z} d\rho_1 \\ &\quad \times \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} z\right) \frac{\exp\left(i \frac{\pi}{\lambda z} \rho_2^2\right)}{i \lambda z} d\rho_2. \end{aligned} \quad (\text{A.9})$$

Befindet sich in der Objektebene eine räumlich inkohärente Intensitätsverteilung⁵⁹,

⁵⁹ Dies ist beispielsweise bei unkorreliert leuchtenden Punktoobjekten der Fall, oder wenn die Probe mit einer Bleuchtungsapertur ausgeleuchtet wird, welche größer als die numerische Apertur des Beobachtungsmikroskopobjektivs ist.

ergibt sich die räumliche Kohärenzfunktion dort zu $\Gamma(\mathbf{\rho}_1, \mathbf{\rho}_2) = \kappa I_O(\mathbf{\rho}_1) \delta(\mathbf{\rho}_1 - \mathbf{\rho}_2)$ [29]. Da das Produkt aus dem zweiten und dritten Fourierintegral 1 wird, reduziert sich Gleichung A.9 mit $\mathbf{\rho} = \mathbf{\rho}_1$ und $\Delta \xi = 2\xi_1$ zu:

$$\Gamma'_f(\Delta \xi) = \frac{\kappa}{(\lambda f)^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\mathbf{\rho}) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f} \mathbf{\rho} \Delta \xi\right) d\mathbf{\rho}. \quad (\text{A.10})$$

Mithilfe der Substitution $\mathbf{v} = \frac{\Delta \xi}{\lambda f}$ lässt sich die räumliche Kohärenzfunktion als Ortsfrequenzspektrum \mathcal{G}_f der räumlich inkohärenten Objektverteilung schreiben:

$$\mathcal{G}_f(\mathbf{v}) = \frac{\kappa}{(\lambda f)^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\mathbf{\rho}) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f} \mathbf{\rho} \mathbf{v}\right) d\mathbf{\rho}. \quad (\text{A.11})$$

Befindet sich die Aperturblende \mathcal{P} mit dem Durchmesser R in der hinteren Brennebene des Mikroskopobjektivs, wird das Ortsfrequenzspektrum \mathcal{G}_f entsprechend beschränkt, woraus sich die maximal übertragbare Ortsfrequenz $\nu_{\max} = \frac{2R}{\lambda f}$ ergibt. Im aberrationsfreien Fall und unter Verwendung einer runden Blende kann das messbare Ortsfrequenzspektrum wie folgt dargestellt werden:

$$\mathcal{G}_f(\mathbf{v}) = \frac{\kappa}{(\lambda f)^2} \mathcal{P}\left(\frac{\mathbf{v}}{\nu_{\max}}\right) \iint_{-\infty}^{+\infty} I_O(\mathbf{\rho}) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f} \mathbf{\rho} \mathbf{v}\right) d\mathbf{\rho}. \quad (\text{A.12})$$

Anhang B

Herleitung der Näherung für das Strehl-Verhältnis eines Weitfelddbildinversionsmikroskops

Das Strehl-Verhältnis eines WIIM lässt sich nach Abschnitt 5.5.1 (Seite 60) wie folgt berechnen:

$$\widetilde{\text{SV}}_{\text{IF}}(\Delta z) = \frac{\iint_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{P}_{\text{Exp}}(\mathbf{r}, \Delta z) \mathcal{P}_{\text{Exp}}^*(-\mathbf{r}, \Delta z) d\mathbf{r}}{\iint \mathcal{P}(\mathbf{r}) \mathcal{P}(-\mathbf{r}) d\mathbf{r}}. \quad (\text{B.1})$$

Hierbei wird von einer generalisierten Pupillenfunktion ausgegangen, welche neben der physischen Begrenzung durch die Blende auch die Phasenfehler Φ berücksichtigt (Abschnitt 5.4.1, Seite 53). Aufgrund der Symmetrieeigenschaften des BII wirkt sich jedoch nur die Differenz $\Delta\Phi(\mathbf{r}, z) = \Phi(\mathbf{r}, z) - \Phi(-\mathbf{r}, z)$ auf das Strehl-Verhältnis aus. Im Fall einer runden, vollständig ausgeleuchteten Pupille kann Gleichung B.1 daher wie folgt geschrieben werden:

$$\widetilde{\text{SV}}_{\text{IF}}(\Delta z) = \frac{\iint_{-\infty}^{+\infty} \text{circ}\left(\frac{\mathbf{r}}{R}\right) \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\Phi(\mathbf{r}, \Delta z)\right) d\mathbf{r}}{\iint_{-\infty}^{+\infty} \text{circ}\left(\frac{\mathbf{r}}{R}\right) d\mathbf{r}}. \quad (\text{B.2})$$

Der Argumentation von Born und Wolf [48] folgend, wird die Exponentialfunktion im Integral in eine Taylor-Reihe bis zur j ten Ordnung entwickelt:

$$\exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\Phi(\mathbf{r}, \Delta z)\right) \approx 1 + i \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\Phi(\mathbf{r}, \Delta z) - \frac{1}{2} \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \Delta\Phi^2(\mathbf{r}, \Delta z) \dots \frac{1}{j!} \left(\frac{2\pi}{\lambda} i\right)^j \Delta\Phi^j(\mathbf{r}, \Delta z). \quad (\text{B.3})$$

Das Strehl-Verhältnis ergibt sich demnach näherungsweise zu:

$$\widetilde{\text{SV}}_{\text{IF}}(\Delta z) \approx 1 + i \frac{2\pi}{\lambda} \overline{\Delta\Phi(\Delta z)} - \frac{1}{2} \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \overline{\Delta\Phi^2(\Delta z)} \dots \frac{1}{j!} \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^j \overline{\Delta\Phi^j(\Delta z)}, \quad (\text{B.4})$$

wobei $\overline{\Delta\Phi^j(\Delta z)}$ der über die Fläche der Pupille gemittelten j ten Potenz der interfe-

rometrischen Aberrationsfunktion $\Delta\Phi$ entspricht:

$$\overline{\Delta\Phi^j(\Delta z)} = \frac{\iint_{-\infty}^{+\infty} \text{circ}\left(\frac{\mathbf{r}}{R}\right) \Delta\Phi^j(\mathbf{r}, \Delta z) \, d\mathbf{r}}{\iint_{-\infty}^{+\infty} \text{circ}\left(\frac{\mathbf{r}}{R}\right) \, d\mathbf{r}}. \quad (\text{B.5})$$

Aufgrund der Definition (Gleichung 5.21, Seite 54) ist $\Delta\Phi$ punktsymmetrisch zur Inversionsachse. Dies hat zur Folge, dass der Mittelwert aller ungeraden Potenzen von $\overline{\Delta\Phi^j(\Delta z)}$ verschwindet. Bricht man die Näherung bei $j = 2$ ab, lässt sich das Strehl-Verhältnis wie folgt berechnen:

$$\widetilde{\text{SV}}_{\text{IF}}(\Delta z) \approx 1 - \frac{1}{2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \overline{\Delta\Phi^2(\Delta z)}. \quad (\text{B.6})$$

Die Quadratwurzel von $\overline{\Delta\Phi^2}$ entspricht dem RMSE-Wert der interferometrischen Aberrationsfunktion.

Anhang C

Einfluss der Beleuchtungsapertur auf die Abbildung in einem Weitfelddbildinversionsmikroskop

Im räumlich inkohärenten Fall kann die räumliche Kohärenzfunktion in der Objektebene als Produkt der Intensitätsverteilung der Probe mit einer Delta-Funktion dargestellt werden [56]:

$$\Gamma(\rho_1, \rho_2) = \kappa I_O(\rho_1) \delta(\rho_1 - \rho_2). \quad (\text{C.1})$$

Wird das zu untersuchende Objekt jedoch beleuchtet und das transmittierte Licht aufgenommen, beeinflussen die Kohärenzeigenschaften des zur Beleuchtung verwendeten Lichts die interferometrische Rekonstruktion der Objektstruktur. Im Fall der Köhlerschen Beleuchtung mit quasi-monochromatischem Licht wird Γ vor allem durch die numerische Apertur des Kollimators bestimmt. Da es sich hierbei um die übliche Beleuchtung in der konventionellen Durchlichtmikroskopie handelt, wird dieser Fall im Folgenden genauer untersucht. Die Diskussion wird am Beispiel eines entozentrischen Beobachtungsmikroskopobjektivs geführt, lässt sich jedoch auch auf telezentrische Objektive übertragen. Abbildung C.1 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Systems von der Lichtquelle bis hin zum Mikroskopobjektiv, welches vereinfacht als Linse dargestellt ist. Des Weiteren können aus Abbildung C.1 die hier verwendeten Notationen für die Kohärenzfunktionen und die entsprechenden Ortsvektoren abgelesen werden.

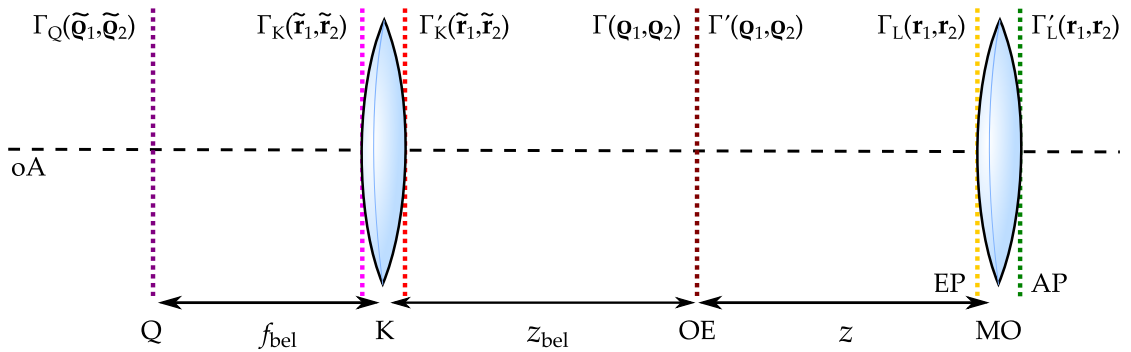


Abbildung C.1: Schematische Darstellung der Köhlerschen Beleuchtung im Durchlichtmikroskop von der Ebene der Lichtquelle bis hin zur Austrittspupille des Mikroskopobjektivs. Die Kollimatoroptik und das Mikroskopobjektiv sind vereinfacht als dünne Linsen dargestellt. (K – Kollimatorlinse, MO – Mikroskopobjektiv, OE – Objektebene, Q – Lichtquelle)

Die räumliche Kohärenzfunktion Γ' direkt hinter einem dünnen Objekt ist durch die Amplitudentransmissionsfunktion⁶⁰ T_A der Probe und die räumliche Kohärenzfunktion Γ des beleuchtenden Wellenfeldes gegeben:

$$\Gamma'(\rho_1, \rho_2) = T_A^*(\rho_1) T_A(\rho_2) \Gamma(\rho_1, \rho_2). \quad (\text{C.2})$$

Nach der Propagation des Lichts durch den Objektraum und das Mikroskopobjektiv ergibt sich die räumliche Kohärenzfunktion in der Austrittspupille zu:

$$\begin{aligned} \Gamma'_L(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} T_A^*(\rho_1) T_A(\rho_2) \Gamma(\rho_1, \rho_2) \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda z} [\rho_2^2 - \rho_1^2]\right) \\ \times \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_1 \rho_1 - \mathbf{r}_2 \rho_2]\right) d\rho_1 d\rho_2 \end{aligned} \quad (\text{C.3})$$

$$C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \frac{\mathcal{P}^*\left(\frac{\mathbf{r}_1}{R}\right) \mathcal{P}\left(\frac{\mathbf{r}_2}{R}\right)}{(\lambda z)^2} \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda f} [\mathbf{r}_1^2 - \mathbf{r}_2^2]\right) \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda z} [\mathbf{r}_2^2 - \mathbf{r}_1^2]\right). \quad (\text{C.4})$$

Nach Goodman [29] kann $\Gamma(\rho_1, \rho_2)$ im Fall der Köhlerschen Beleuchtung näherungsweise als Produkt eines komplexen Vorfaktors mit der Fouriertransformation des Betragsquadrats der Beleuchtungspupillenfunktion \mathcal{P}_{bel} angegeben werden:

$$\begin{aligned} \Gamma(\rho_1, \rho_2) = \frac{\kappa}{(\lambda z_{\text{bel}})^2} \exp\left(-i \frac{\pi}{\lambda z_{\text{bel}}} [\rho_2^2 - \rho_1^2]\right) \\ \times \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \left| \mathcal{P}_{\text{bel}}\left(\frac{\bar{\mathbf{r}}}{R_{\text{bel}}}\right) \right|^2 \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda z_{\text{bel}}} [\rho_2 - \rho_1] \bar{\mathbf{r}}\right) d\bar{\mathbf{r}}. \end{aligned} \quad (\text{C.5})$$

Hierfür wird vorausgesetzt, dass $A_P A_Q \gg (\lambda f_{\text{bel}})^2$ gilt, wobei A_P die Fläche der Linse ist und A_Q die der Lichtquelle. Auch in diesem Fall ist $\kappa = \lambda^2/\pi$. Aufgrund des Betragsquadrats wirken sich Aberrationen der Kollimatoroptik im Rahmen der gemachten Näherungen nicht auf Γ aus. Werden die Substitutionen $\bar{\rho} = \frac{\rho_1 + \rho_2}{2}$ und $\Delta\rho = \rho_2 - \rho_1$ durchgeführt, ergibt sich Gleichung C.5 zu:

$$\Gamma(\bar{\rho}, \Delta\rho) = \frac{\kappa}{(\lambda z_{\text{bel}})^2} \exp\left(-i \frac{\pi}{\lambda z_{\text{bel}}} [2\bar{\rho} \Delta\rho]\right) \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \left| \mathcal{P}_{\text{bel}}\left(\frac{\bar{\mathbf{r}}}{R_{\text{bel}}}\right) \right|^2 \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda z_{\text{bel}}} \Delta\rho \bar{\mathbf{r}}\right) d\bar{\mathbf{r}}. \quad (\text{C.6})$$

Als Ergebnis der Fouriertransformation von $|\mathcal{P}_{\text{bel}}|^2$ erhält man im Fall einer runden Pupille eine Bessel-Sinc-Funktion, welche eine Funktion des Differenzvektors

⁶⁰ In einem Auflichtmikroskop müsste entsprechend die Amplitude des zurückgestreuten Lichts betrachtet werden.

$\Delta \rho$ ist. Diese ist nur für kleine $\Delta \rho$ deutlich von Null verschieden, daher ist in einem Bereich um die optische Achse auch die Phase des komplexen Vorfaktors sehr klein. Dort gilt folglich:

$$\exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda z_{\text{bel}}}[2\bar{\rho}\Delta\rho]\right) \approx 1. \quad (\text{C.7})$$

Die Kohärenzfunktion des beleuchtenden Wellenfeldes ist somit nur von $\Delta \rho$ abhängig und daher im Rahmen dieser Näherung ortsinvariant:

$$\Gamma(\Delta\rho) \approx \frac{\kappa}{(\lambda z_{\text{bel}})^2} \iint \left| \mathcal{P}_{\text{bel}}\left(\frac{\bar{\mathbf{r}}}{R_{\text{bel}}}\right) \right|^2 \exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda z_{\text{bel}}}\Delta\rho\bar{\mathbf{r}}\right) d\bar{\mathbf{r}}. \quad (\text{C.8})$$

Gleichung C.3 ergibt sich damit zu:

$$\begin{aligned} \Gamma'(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = C(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) & \iiint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{T}_A^*\left(\bar{\rho} - \frac{\Delta\rho}{2}\right) \tilde{T}_A\left(\bar{\rho} + \frac{\Delta\rho}{2}\right) \Gamma(\Delta\rho) \\ & \times \exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda z} \left[\mathbf{r}_1 \left(\bar{\rho} - \frac{\Delta\rho}{2}\right) - \mathbf{r}_2 \left(\bar{\rho} + \frac{\Delta\rho}{2}\right) \right] \right) d(\Delta\rho) d\bar{\rho}. \end{aligned} \quad (\text{C.9})$$

Für diese Darstellung wurde $\tilde{T}_A(\rho)$ wie folgt definiert:

$$\tilde{T}_A(\rho) = T_A(\rho) \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}\rho^2\right). \quad (\text{C.10})$$

Wird die komplexe Kohärenzfunktion Γ' in der Austrittspupille des Mikroskopobjektivs mithilfe eines BILs gemessen, gilt $\mathbf{r}_2 = -\mathbf{r}_1 = \mathbf{r}$ und $\Delta\mathbf{r} = \mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1 = 2\mathbf{r}$. Durch Einführung des Ortsfrequenzvektors $\mathbf{v} = \frac{2\mathbf{r}}{\lambda z}$ ergibt sich das Ortsfrequenzspektrum der rekonstruierbaren Objektverteilung:

$$\begin{aligned} \mathcal{G}(\mathbf{v}) = C(\mathbf{v}) & \iiint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{T}_A^*\left(\bar{\rho} - \frac{\Delta\rho}{2}\right) \tilde{T}_A\left(\bar{\rho} + \frac{\Delta\rho}{2}\right) \exp\left(-i\frac{2\pi}{\lambda z}\mathbf{v}\rho\right) d\bar{\rho} \\ & \times \Gamma(\Delta\rho) d(\Delta\rho). \end{aligned} \quad (\text{C.11})$$

Wie bereits in Abschnitt 5.1.2 (Seite 40) erläutert, gilt für runde Pupillen $|\mathcal{P}(\mathbf{r}/R)|^2 = \mathcal{P}(\Delta\mathbf{r}/2R)$, woraus die Grenzfrequenz $\nu_{\text{max}} = \frac{2R}{\lambda z}$ folgt. Im aberrationsfreien Fall reduziert sich C daher zu:

$$C(\mathbf{v}) = \frac{\kappa}{(\lambda z)^2} \mathcal{P}\left(\frac{\mathbf{v}}{\nu_{\text{max}}}\right). \quad (\text{C.12})$$

Das Integral über alle von $\Delta \rho$ abhängigen Terme in Gleichung C.11 entspricht einer Fouriertransformation, für welche im Folgenden die symbolische Schreibweise $\mathcal{F}\{\cdot\}(\mathbf{v})$ verwendet wird. Nach dem Faltungstheorem [56] ist es möglich,

Gleichung C.11 folgendermaßen darzustellen:

$$\begin{aligned} \mathcal{G}(\mathbf{v}) = C(\mathbf{v}) \iint_{-\infty}^{+\infty} \mathcal{F} \left\{ \tilde{T}_A^* \left(\bar{\rho} - \frac{\Delta \rho}{2} \right) \right\} (\mathbf{v}) \otimes \mathcal{F} \left\{ \tilde{T}_A \left(\bar{\rho} + \frac{\Delta \rho}{2} \right) \right\} (\mathbf{v}) \\ \times \Gamma(\Delta \rho) d(\Delta \rho) . \end{aligned} \quad (\text{C.13})$$

Die Faltungsoperation ist in dieser Notation durch \otimes dargestellt. Nach dem Verschiebungstheorem [56] können die $\Delta \rho$ - und $\bar{\rho}$ -abhängigen Anteile der beiden Fouriertransformationen aus Gleichung C.13 wie folgt separiert werden:

$$\mathcal{F} \left\{ \tilde{T}_A \left(\bar{\rho} + \frac{\Delta \rho}{2} \right) \right\} (\mathbf{v}) = \exp \left(2\pi i \mathbf{v} \frac{\Delta \rho}{2} \right) \mathcal{F} \left\{ \tilde{T}_A(\bar{\rho}) \right\} (\mathbf{v}) \quad (\text{C.14})$$

$$\begin{aligned} \mathcal{F} \left\{ \tilde{T}_A^* \left(\bar{\rho} - \frac{\Delta \rho}{2} \right) \right\} (\mathbf{v}) &= \exp \left(-2\pi i \mathbf{v} \frac{\Delta \rho}{2} \right) \mathcal{F} \left\{ \tilde{T}_A^*(\bar{\rho}) \right\} (\mathbf{v}) \\ &= \exp \left(-2\pi i \mathbf{v} \frac{\Delta \rho}{2} \right) \left[\mathcal{F} \left\{ \tilde{T}_A(\bar{\rho}) \right\} (-\mathbf{v}) \right]^* . \end{aligned} \quad (\text{C.15})$$

Das Symbol $*$ stellt hierbei die komplexe Konjugation dar. Im Weiteren entspricht die Fouriertransformation von \tilde{T} dem Amplitudentransmissionsspektrum $K(\mathbf{v}) = \mathcal{F} \left\{ \tilde{T}_A(\bar{\rho}) \right\} (\mathbf{v})$. Stellt man die Faltungsoperation nun in Integralform dar, ergibt sich Gleichung C.13 zu:

$$\begin{aligned} \mathcal{G}(\mathbf{v}) = C(\mathbf{v}) \iint_{-\infty}^{+\infty} K^*(-\tilde{\mathbf{v}}) K(\mathbf{v} - \tilde{\mathbf{v}}) \iint_{-\infty}^{+\infty} \Gamma(\Delta \rho) \exp \left(2\pi i \mathbf{v} \frac{\Delta \rho}{2} \right) \\ \times \exp(2\pi i \tilde{\mathbf{v}} \Delta \rho) d(\Delta \rho) d\tilde{\mathbf{v}} . \end{aligned} \quad (\text{C.16})$$

Die Integration über $\Delta \rho$ repräsentiert eine Fouriertransformation und liefert mithilfe des Faltungstheorems sowie Gleichung C.8 folgendes Ergebnis:

$$\begin{aligned} \mathcal{F} \left\{ \Gamma(\Delta \rho) \exp \left(2\pi i \mathbf{v} \frac{\Delta \rho}{2} \right) \right\} (\tilde{\mathbf{v}}) &= \mathcal{F} \left\{ \Gamma(\Delta \rho) \right\} (\tilde{\mathbf{v}}) \otimes \mathcal{F} \left\{ \exp \left(2\pi i \mathbf{v} \frac{\Delta \rho}{2} \right) \right\} (\tilde{\mathbf{v}}) \\ &= \frac{\kappa}{\lambda z_{\text{bel}}} \left| \mathcal{P}_{\text{bel}} \left(\frac{\tilde{\mathbf{v}}}{\tilde{v}_{\text{bel}}} \right) \right|^2 \otimes \delta \left(\frac{\mathbf{v}}{2} - \tilde{\mathbf{v}} \right) \\ &= \frac{\kappa}{\lambda z_{\text{bel}}} \left| \mathcal{P}_{\text{bel}} \left(\frac{\frac{\mathbf{v}}{2} - \tilde{\mathbf{v}}}{\tilde{v}_{\text{bel}}} \right) \right|^2 . \end{aligned} \quad (\text{C.17})$$

Es handelt sich dabei demnach um die Pupillenfunktion \mathcal{P}_{bel} des Kollimators,

welche den Radius $\tilde{v}_{\text{bel}} = \frac{R_{\text{bel}}}{\lambda z_{\text{bel}}}$ ⁶¹ besitzt und um $\mathbf{v}/2$ zentriert ist. Das mit einem BII in der Austrittspupille des Mikroskopobjektivs bestimmbare Ortsfrequenzspektrum ergibt sich somit zu:

$$\mathcal{G}(\mathbf{v}) = \frac{\kappa}{\lambda^4 z^2 z_{\text{bel}}^2} \mathcal{P} \left(\frac{\mathbf{v}}{v_{\text{max}}} \right) \iint_{-\infty}^{+\infty} K^*(-\tilde{\mathbf{v}}) K(\mathbf{v} - \tilde{\mathbf{v}}) \left| \mathcal{P}_{\text{bel}} \left(\frac{\frac{\mathbf{v}}{2} - \tilde{\mathbf{v}}}{\tilde{v}_{\text{bel}}} \right) \right|^2 d\tilde{\mathbf{v}}. \quad (\text{C.18})$$

Für eine unendlich große Beleuchtungspupille ($\tilde{v}_{\text{bel}} \rightarrow \infty$) entspricht der Integralterm der Autokorrelation des Amplitudentransmissionsspektrums $K(\mathbf{v})$. Diese wiederum repräsentiert die Fouriertransformation der Intensitätsverteilung $I_O = |T_A|^2$ in der Objektebene:

$$\mathcal{G}(\mathbf{v}) = \frac{\kappa}{\lambda^4 z^2 z_{\text{bel}}^2} \mathcal{P} \left(\frac{\mathbf{v}}{v_{\text{max}}} \right) \iint_{-\infty}^{+\infty} K^*(-\tilde{\mathbf{v}}) K(\mathbf{v} - \tilde{\mathbf{v}}) d\tilde{\mathbf{v}} \quad (\text{C.19})$$

$$= \frac{\kappa}{\lambda^4 z^2 z_{\text{bel}}^2} \mathcal{P} \left(\frac{\mathbf{v}}{v_{\text{max}}} \right) \mathcal{F} \{ \tilde{T}_A \} (\mathbf{v}) \otimes \left[\mathcal{F} \{ \tilde{T}_A \} (-\mathbf{v}) \right]^* \quad (\text{C.20})$$

$$= \frac{\kappa}{\lambda^4 z^2 z_{\text{bel}}^2} \mathcal{P} \left(\frac{\mathbf{v}}{v_{\text{max}}} \right) \mathcal{F} \left\{ \left| \tilde{T}_A \right|^2 \right\} (\mathbf{v}) \quad (\text{C.21})$$

$$= \frac{\kappa}{\lambda^4 z^2 z_{\text{bel}}^2} \mathcal{P} \left(\frac{\mathbf{v}}{v_{\text{max}}} \right) \mathcal{F} \{ I_O \} (\mathbf{v}). \quad (\text{C.22})$$

Dieses Resultat entspricht erwartungsgemäß dem Ergebnis für eine räumlich inkohärent leuchtende Objektstruktur (Kapitel 5.1.2, Seite 40).

⁶¹ Die Fouriertransformation von Γ liefert:

$$\begin{aligned} \mathcal{F} \left\{ \Gamma(\Delta \rho) \right\} \left(\tilde{\mathbf{v}} = \frac{\Delta \tilde{\mathbf{r}}}{\lambda z} \right) &= \frac{\kappa}{(\lambda z_{\text{bel}})^2} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \left| \mathcal{P}_{\text{bel}} \left(\frac{\tilde{\mathbf{r}}}{R_{\text{bel}}} \right) \right|^2 \exp \left(i \frac{2\pi}{\lambda z_{\text{bel}}} \Delta \rho \tilde{\mathbf{r}} \right) \exp \left(-i \frac{2\pi}{\lambda z} \Delta \rho \Delta \tilde{\mathbf{r}} \right) d\tilde{\mathbf{r}} d\Delta \rho \\ &= \frac{\kappa}{(\lambda z_{\text{bel}})^2} \iiint_{-\infty}^{+\infty} \left| \mathcal{P}_{\text{bel}} \left(\frac{\tilde{\mathbf{r}}}{R_{\text{bel}}} \right) \right|^2 \delta \left(\tilde{\mathbf{r}} - \frac{z_{\text{bel}}}{z} \Delta \tilde{\mathbf{r}} \right) d\tilde{\mathbf{r}} d\tilde{\mathbf{r}} \\ &= \frac{\kappa}{(\lambda z_{\text{bel}})^2} \left| \mathcal{P}_{\text{bel}} \left(\frac{\Delta \tilde{\mathbf{r}}}{\frac{z}{z_{\text{bel}}} R_{\text{bel}}} \right) \right|^2 = \frac{\kappa}{(\lambda z_{\text{bel}})^2} \left| \mathcal{P}_{\text{bel}} \left(\frac{\tilde{\mathbf{v}}}{\tilde{v}_{\text{bel}}} \right) \right|^2. \end{aligned}$$

Somit beträgt der in die Austrittspupille des MO_{det} projizierte Radius der Pupillenfunktion \mathcal{P}_{bel} $\tilde{v}_{\text{bel}} = \frac{R_{\text{bel}}}{\lambda z_{\text{bel}}}$.

Anhang D

Herleitung des Ortsfrequenzspektrums für $\bar{\lambda}$ unter polychromatischen Bedingungen

Im Folgenden wird die Struktur der mit einem BII in der Austrittspupille eines Mikroskopobjektivs gemessenen Kohärenzfunktion untersucht, welche durch einen einzelnen polychromatischen Lichtpunkt im Objektraum hervorgerufen wird. Der Interferenzterm I_{IF} innerhalb der durch das Interferometer hindurch abgebildeten Austrittspupille ergibt sich unter der Annahme eines gaußförmigen Spektrums nach :

$$I_{\text{IF}}(x, \Delta\zeta_{\text{IF}}) = C \exp\left(-4 \ln(2) \left[\frac{2x \sin(w) - \Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c}\right]^2\right) \cos\left(\frac{2\pi}{\bar{\lambda}} [2x \sin(w) - \Delta\zeta_{\text{IF}}]\right). \quad (\text{D.1})$$

Hierbei stellt x die Pupillenkoordinate dar und $\Delta\zeta_{\text{IF}}$ die optische Wegdifferenz zwischen den beiden Interferometerarmen. Die für den Lichtpunkt als konstant angenommenen Parameter, wie beispielsweise dessen Intensität, werden hierbei in der Konstanten C zusammengefasst. Durch die Fouriertransformation dieses Ausdrucks lässt sich die mathematische Struktur der komplexen Kohärenzfunktion an jedem Punkt in der Pupille durch das Spektrum $\mathcal{S}(x, \lambda)$ berechnen. Da innerhalb des Interferometers nur eine endliche Wegdifferenz $\Delta\zeta_{\text{max}}$ realisiert werden kann, ergeben sich die Integrationsgrenzen von $-\Delta\zeta_{\text{max}}/2$ bis $+\Delta\zeta_{\text{max}}/2$. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird die Variablensubstitution $\hat{x} = 2x \sin(w)$ durchgeführt und die Exponentialfunktion durch e abgekürzt:

$$\mathcal{S}(\hat{x}, \lambda) = C \int_{-\Delta\zeta_{\text{max}}/2}^{+\Delta\zeta_{\text{max}}/2} e^{-4 \ln(2) \left[\frac{\hat{x} - \Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c}\right]^2} \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} [\hat{x} - \Delta\zeta_{\text{IF}}]\right) e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\zeta_{\text{IF}}} d(\Delta\zeta_{\text{IF}}). \quad (\text{D.2})$$

Durch die Exponentialdarstellung des Kosinus ergibt sich daraus:

$$\begin{aligned} \mathcal{S}(\hat{x}, \lambda) &= \frac{C}{2} \int_{-\Delta\zeta_{\text{max}}/2}^{+\Delta\zeta_{\text{max}}/2} e^{-4 \ln(2) \left[\frac{\hat{x} - \Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c}\right]^2} \left(e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \hat{x}} e^{-i \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\zeta_{\text{IF}}} + e^{-i \frac{2\pi}{\lambda} \hat{x}} e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\zeta_{\text{IF}}} \right) e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\zeta_{\text{IF}}} d(\Delta\zeta_{\text{IF}}) \\ &= \frac{C}{2} \int_{-\Delta\zeta_{\text{max}}/2}^{+\Delta\zeta_{\text{max}}/2} e^{-4 \ln(2) \left[\frac{\hat{x} - \Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c}\right]^2} \left(e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \hat{x}} e^{i \Delta\zeta_{\text{IF}} \left(\frac{2\pi}{\lambda} - \frac{2\pi}{\lambda}\right)} + e^{-i \frac{2\pi}{\lambda} \hat{x}} e^{i \Delta\zeta_{\text{IF}} \left(\frac{2\pi}{\lambda} + \frac{2\pi}{\lambda}\right)} \right) d(\Delta\zeta_{\text{IF}}). \end{aligned} \quad (\text{D.3})$$

Für das Spektrum bei der mittleren Wellenlänge $\bar{\lambda}$ erhält man folglich:

$$\mathcal{S}(\hat{x}, \bar{\lambda}) = \frac{C}{2} \int_{-\Delta\zeta_{\max}/2}^{+\Delta\zeta_{\max}/2} e^{-4\ln(2)\left[\frac{\hat{x}-\Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c}\right]^2} \left(e^{i\frac{2\pi}{\lambda}\hat{x}} + e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}\hat{x}} e^{i\Delta\zeta_{\text{IF}}2\frac{2\pi}{\lambda}} \right) d(\Delta\zeta_{\text{IF}}). \quad (\text{D.4})$$

Dieses Integral kann in zwei Teile aufgespalten werden, wobei die nur von \hat{x} abhängigen Exponentialfunktionen jeweils vor die Integrale gezogen werden können:

$$\begin{aligned} \mathcal{S}(\hat{x}, \bar{\lambda}) &= C \frac{e^{i\frac{2\pi}{\lambda}\hat{x}}}{2} \int_{-\Delta\zeta_{\max}/2}^{+\Delta\zeta_{\max}/2} e^{-4\ln(2)\left[\frac{\hat{x}-\Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c}\right]^2} d(\Delta\zeta_{\text{IF}}) \\ &\quad + C \frac{e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}\hat{x}}}{2} \int_{-\Delta\zeta_{\max}/2}^{+\Delta\zeta_{\max}/2} e^{-4\ln(2)\left[\frac{\hat{x}-\Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c}\right]^2} e^{i\Delta\zeta_{\text{IF}}2\frac{2\pi}{\lambda}} d(\Delta\zeta_{\text{IF}}). \end{aligned} \quad (\text{D.5})$$

Es ist möglich, die Integrationsgrenzen im ersten Integral zu einer Rechteckfunktion zusammenzufassen. Dadurch wird deutlich, dass \mathcal{S}_1 als Faltung der Einhüllenden mit einer Rechteckfunktion dargestellt werden kann:

$$\mathcal{S}_1(\hat{x}, \bar{\lambda}) = C \frac{e^{i\frac{2\pi}{\lambda}\hat{x}}}{2} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-4\ln(2)\left[\frac{\hat{x}-\Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c}\right]^2} \text{rect}(\Delta\zeta_{\text{IF}}, \Delta\zeta_{\max}) d(\Delta\zeta_{\text{IF}}). \quad (\text{D.6})$$

An dieser Stelle ist es zweckmäßig, \hat{x} zurückzusubstituieren und die Hilfsvariable $\Delta\hat{\zeta}_{\text{IF}} = \Delta\zeta_{\text{IF}}/(2\sin(w))$ einzuführen:

$$\begin{aligned} \mathcal{S}_1(x, \bar{\lambda}) &= C e^{i\frac{2\pi}{\lambda}2x\sin(w)} \sin(w) \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-4\ln(2)\left[\frac{2\sin(w)}{l_c}(x-\Delta\hat{\zeta}_{\text{IF}})\right]^2} \text{rect}\left(\Delta\hat{\zeta}_{\text{IF}}, \frac{\Delta\zeta_{\max}}{2\sin(w)}\right) d(\Delta\hat{\zeta}_{\text{IF}}) \\ &= C e^{i\frac{2\pi}{\lambda}2x\sin(w)} \sin(w) \left[e^{-4\ln(2)\left[\frac{2x\sin(w)}{l_c}\right]^2} \otimes \text{rect}(x, \Delta x) \right]. \end{aligned} \quad (\text{D.7})$$

Die erste Exponentialfunktion in Gleichung D.7 repräsentiert einen von w abhängigen und in x linearen Phasenverlauf, welcher den Schwinkel des polychromatischen Lichtpunkts beschreibt. Der darauffolgende $\sin(w)$ -Term stellt einen Skalierungsfaktor für die in den eckigen Klammern zusammengefasste Faltungsoperation dar. Er normiert dieses Faltungsintegral, welches sonst aufgrund der von $\sin(w)$ abhängigen Grenzen für $w \rightarrow 0^\circ$ gegen Unendlich läuft.

Aufgrund des Phasenterms $e^{i\zeta 2\frac{2\pi}{\lambda}}$ im zweiten Integral in Gleichung D.5 kommt es zu einer schnellen, komplexwertigen Oszillation unter der Einhüllenden:

$$\mathcal{S}_2(x, \bar{\lambda}) = C \frac{e^{-i\frac{2\pi}{\lambda} 2x \sin(w)}}{2} \int_{-\Delta\zeta_{\max}/2}^{+\Delta\zeta_{\max}/2} e^{-4 \ln(2) \left[\frac{2x \sin(w) - \Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c} \right]^2} e^{i\Delta\zeta_{\text{IF}} 2\frac{2\pi}{\lambda}} d(\Delta\zeta_{\text{IF}}) \quad (\text{D.8})$$

$$\begin{aligned} &= C \frac{e^{-i\frac{2\pi}{\lambda} 2x \sin(w)}}{2} \int_{-\Delta\zeta_{\max}/2}^{+\Delta\zeta_{\max}/2} e^{-4 \ln(2) \left[\frac{2x \sin(w) - \Delta\zeta_{\text{IF}}}{l_c} \right]^2} \\ &\quad \times \left[\cos \left(\frac{2\pi}{\bar{\lambda}} 2\Delta\zeta_{\text{IF}} \right) + i \sin \left(\frac{2\pi}{\bar{\lambda}} 2\Delta\zeta_{\text{IF}} \right) \right] d(\Delta\zeta_{\text{IF}}). \end{aligned} \quad (\text{D.9})$$

Der Beitrag dieses Integrals oszilliert daher um einen im Vergleich zu $\mathcal{S}_1(x, \bar{\lambda})$ kleinen Wert und kann daher näherungsweise vernachlässigt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] S. W. Hell und E. H. K. Stelzer, „Properties of a 4pi confocal fluorescence microscope,“ J. Opt. Soc. Am. A 9, 2159–2166 (1992).
- [2] S. W. Hell, S. Lindek, C. Cremer, und E. H. K. Stelzer, „Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-b 4pi confocal microscopy,“ Opt. Lett. 19, 222–224 (1994).
- [3] M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, und J. W. Sedat, „I5m: 3d widefield light microscopy with better than 100nm axial resolution,“ J. Microsc. 195, 10–16 (1999).
- [4] J. Bewersdorf, R. Schmidt, und S. W. Hell, „Comparison of i5m and 4pi-microscopy,“ J. Microsc. 222, 105–117 (2006).
- [5] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, und H. F. Hess, „Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution,“ Science 313, 1642–1645 (2006).
- [6] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, und M. D. Mason, „Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy,“ Biophys. J. 91, 4258–4272 (2006).
- [7] M. J. Rust, M. Bates, und X. Zhuang, „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm),“ Nat. Methods 3, 793 (2006).
- [8] S. W. Hell und J. Wichmann, „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy,“ Opt. Lett. 19, 780–782 (1994).
- [9] M. G. L. Gustafsson, „Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy,“ J. Microsc. 198, 82–87 (2000).
- [10] L. Schermelleh, P. M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M. C. Cardoso, D. A. Agard, M. G. Gustafsson, H. Leonhardt, und J. W. Sedat, „Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3d structured illumination microscopy,“ Science 320, 1332–1336 (2008).
- [11] G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, und H. F. Hess, „Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3d cellular ultrastructure,“ Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 106, 3125–3130 (2009).
- [12] E. Abbe, *Die Lehre von der Bildentstehung im Mikroskop* (Vieweg Verlag, 1910).

- [13] A. G. Valdecasas, D. Marshall, und M. Jose, „Extended depth-of-focus algorithms in brightfield microscopy,“ *Microsc. Anal.*, 9 (2002).
- [14] B. Forster, D. Van De Ville, J. Berent, D. Sage, und M. Unser, „Complex wavelets for extended depth-of-field: A new method for the fusion of multichannel microscopy images,“ *Microsc. Res. Techniq.* 65, 33–42 (2004).
- [15] J. Meneses, M. A. Suarez, J. Braga, und T. Gharbi, „Extended depth of field using shapelet-based image analysis,“ *Appl. Opt.* 47, 169–178 (2008).
- [16] E. R. Dowski und W. T. Cathey, „Extended depth of field through wave-front coding,“ *Appl. Opt.* 34, 1859–1866 (1995).
- [17] T. Zhao, T. Mauger, und G. Li, „Optimization of wavefront-coded infinity-corrected microscope systems with extended depth of field,“ *Biomed. Opt. Express* 4, 1464–1471 (2013).
- [18] V. N. Le, Z. Fan, und Q. D. Duong, „To extend the depth of field by using the asymmetrical phase mask and its conjugation phase mask in wavefront coding imaging systems,“ *Appl. Opt.* 54, 3630–3634 (2015).
- [19] J. Durnin, J. J. Miceli Jr, und J. H. Eberly, „Diffraction-free beams,“ *Phys. Rev. Lett.* 58, 1499 (1987).
- [20] E. J. Botcherby, R. Juškaitis, und T. Wilson, „Scanning two photon fluorescence microscopy with extended depth of field,“ *Opt. Commun.* 268, 253–260 (2006).
- [21] K. Wicker und R. Heintzmann, „Interferometric resolution improvement for confocal microscopes,“ *Opt. Express* 15, 12206–12216 (2007).
- [22] D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Imaging properties of different types of microscopes in combination with an image inversion interferometer,“ *Opt. Commun.* 332, 301–310 (2014).
- [23] K. Itoh und Y. Ohtsuka, „Interferometric imaging of a thermally luminous two-dimensional object,“ *Opt. Commun.* 48, 75–79 (1983).
- [24] O. Bryngdahl und A. Lohmann, „Variable magnification in incoherent holography,“ *Appl. Opt.* 9, 231–232 (1970).
- [25] D. N. Naik, T. Ezawa, Y. Miyamoto, und M. Takeda, „3-d coherence holography using a modified sagnac radial shearing interferometer with geometric phase shift,“ *Opt. Express* 17, 10633–10641 (2009).
- [26] D. L. Marks, R. A. Stack, und D. J. Brady, „Three-dimensional coherence imaging in the fresnel domain,“ *Appl. Opt.* 38, 1332–1342 (1999).
- [27] F. Zernike, „The concept of degree of coherence and its application to optical problems,“ *Physica* 5, 785–795 (1938).
- [28] P. H. Van Cittert, „Kohärenz-Probleme,“ *Physica* 6, 1129–1138 (1939).

- [29] J. W. Goodman, *Statistical Optics* (John Wiley & Sons, 2000).
- [30] K. Itoh und Y. Ohtsuka, „Interferometric image reconstruction through the turbulent atmosphere,“ *Appl. Opt.* 20, 4239–4244 (1981).
- [31] C. Roddier und F. Roddier, „High angular resolution observations of alpha orionis with a rotation shearing interferometer,“ *Astrophys. J.* 270, L23–L26 (1983).
- [32] F. Roddier und C. Roddier, „An image reconstruction of alpha orionis,“ *Astrophys. J.* 295, L21–L23 (1985).
- [33] F. Roddier, „Interferometric imaging in optical astronomy,“ *Phys. Rep.* 170, 99–166 (1988).
- [34] I. J. LaHaie, „Inverse source problem for three-dimensional partially coherent sources and fields,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 2, 35–45 (1985).
- [35] K. Itoh und Y. Ohtsuka, „Fourier-transform spectral imaging: retrieval of source information from three-dimensional spatial coherence,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 3, 94–100 (1986).
- [36] J. Rosen und A. Yariv, „General theorem of spatial coherence: application to three-dimensional imaging,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 13, 2091–2095 (1996).
- [37] H. Arimoto, K. Yoshimori, und K. Itho, „Passive interferometric 3-d imaging and incoherence gating,“ *Opt. Commun.* 170, 319–329 (1999).
- [38] H. Arimoto, K. Yoshimori, und K. Itho, „Interferometric three-dimensional imaging based on retrieval generalized radiance distribution,“ *Opt. Rev.* 7, 25–33 (2000).
- [39] K. Yoshimori, „Interferometric spectral imaging for three-dimensional objects illuminated by a natural light source,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 18, 765–770 (2001).
- [40] M. Sasamoto und K. Yoshimori, „First experimental report on fully passive interferometric three-dimensional imaging spectrometry,“ *Jpn. J. Appl. Phys.* 48, 09LB03 (2009).
- [41] D. N. Naik, G. Pedrini, M. Takeda, und W. Osten, „Spectrally resolved incoherent holography: 3d spatial and spectral imaging using a mach-zehnder radial-shearing interferometer,“ *Opt. Lett.* 39, 1857–1860 (2014).
- [42] P. Potluri, M. R. Fetterman, und D. J. Brady, „High depth of field microscopic imaging using an interferometric camera,“ *Opt. Express* 8, 624–630 (2001).
- [43] D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Widefield microscopy with infinite depth of field and enhanced lateral resolution based on an image inverting interferometer,“ *Opt. Commun.* 342, 102–108 (2015).
- [44] N. Sandeau und H. Giovannini, „Increasing the lateral resolution of 4pi fluorescence microscopes,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 23, 1089–1095 (2006).

- [45] N. Sandeau, L. Wawreziniek, P. Ferrand, H. Giovannini, und H. Rigneault, „Increasing the lateral resolution of scanning microscopes by a factor of two using 2-image microscopy,“ *J. Eur. Opt. Soc.-Rapid.* 4, 090401–090406 (2009).
- [46] D. Weigel, R. Foerster, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Enhanced resolution of microscopic objects by image inversion interferometry,“ *Opt. Express* 19, 26451–26462 (2011).
- [47] D. Weigel, A. Kießling, und R. Kowarschik, *Jahrbuch Optik und Feinmechanik*, Kapitel: Einsatz der Bildinversionsinterferometrie zur Erhöhung der Auflösung in der konfokalen Mikroskopie, 35–52 (OPTIK-Verlag, 2015).
- [48] M. Born und E. Wolf, *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light* (Cambridge University Press, 1999).
- [49] H. Haferkorn, *Optik: Physikalisch-technische Grundlagen und Anwendungen* (Verlag Johann Ambrosius Barth Leipzig, 1994).
- [50] E. Hecht, *Optik* (Oldenbourg Verlag, 2005).
- [51] H. Gross, *Handbook of Optical Systems, Fundamentals of Technical Optics*, Band 1 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005).
- [52] A. Köhler, „New method of illumination for photomicrographical purposes,“ *J. R. Microsc. Soc.* 14, 261–262 (1894).
- [53] E. Wolf, „Electromagnetic diffraction in optical systems. i. an integral representation of the image field,“ *Proc. R. Soc. A* 253, 349–357 (1959).
- [54] B. Richards und E. Wolf, „Electromagnetic diffraction in optical systems. ii. structure of the image field in an aplanatic system,“ *Proc. R. Soc. A* 253, 358–379 (1959).
- [55] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics* (McGraw-Hill, 1968).
- [56] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics* (Roberts and Company Publishers, 2005).
- [57] T. Wilson, *Confocal Microscopy* (Academic Press Inc., 1990).
- [58] C. J. R. Sheppard, „Depth of field in optical microscopy,“ *J. Microsc.* 149, 73–75 (1988).
- [59] W. Singer, M. Totzeck, und H. Gross, *Handbook of Optical Systems, Physical Image Formation*, Band 2 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006).
- [60] B. Dörband, H. Gross, und H. Müller, *Handbook of Optical Systems, Metrology of Optical Components and Systems*, Band 5 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012).

- [61] A. Maréchal, „Étude des effets combinés de la diffraction et des aberrations géométriques sur l'image d'un point lumineux,“ *Rev. d'Opt.* 26, 257–277 (1947).
- [62] F. Zernike, „Beugungstheorie des Schneidenvorgangs und seiner verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode,“ *Physica* 1, 689–704 (1934).
- [63] V. N. Mahajan, „Zernike circle polynomials and optical aberrations of systems with circular pupils,“ *Appl. Opt.* 33, 8121–8124 (1994).
- [64] L. N. Thibos, R. A. Applegate, J. T. Schwiegerling, und R. Webb, „Standards for reporting the optical aberrations of eyes,“ *J. Refract. Surg.* 18, S652–S660 (2002).
- [65] L. Mandel und E. Wolf, *Optical coherence and quantum optics* (Cambridge University Press, 1995).
- [66] E. Wolf, „A macroscopic theory of interference and diffraction of light from finite sources,“ *Nature* 172, 535 (1953).
- [67] N. Wiener, „Generalized harmonic analysis,“ *Acta Math.* 55, 117–258 (1930).
- [68] A. Khintchine, „Korrelationstheorie der stationären stochastischen Prozesse,“ *Math. Annal.* 109, 604–615 (1934).
- [69] A. A. Michelson, „The relative motion of the earth and of the luminiferous ether,“ *Am. J. Sci.* 22, 120–129 (1881).
- [70] A. J. Devaney, „The inverse problem for random sources,“ *J. Math. Phys.* 20, 1687–1691 (1979).
- [71] W. H. Carter und E. Wolf, „Correlation theory of wavefields generated by fluctuating, three-dimensional, primary, scalar sources,“ *Opt. Acta* 28, 227–244 (1981).
- [72] L. Mertz, *Transformations in optics*, Band 2 (Wiley New York, 1965).
- [73] W. J. Bates, „A wavefront shearing interferometer,“ *Proc. Phys. Soc.* 59, 940 (1947).
- [74] P. Hariharan und D. Sen, „Radial shearing interferometer,“ *J. Sci. Instrum.* 38, 428 (1961).
- [75] J. D. Armitage Jr. und A. Lohmann, „Rotary shearing interferometry,“ *Opt. Acta* 12, 185–192 (1965).
- [76] M. Murty und E. Hagerott, „Rotational-shearing interferometry,“ *Appl. Opt.* 5, 615–619 (1966).
- [77] D. Weigel, A. Kießling, und R. Kowarschik, „Verfahren zur hochaufgelösten Messung des komplexen Kohärenzgrades,“ in „114. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angewandte Optik (DGaO),“ P23 (Braunschweig, Deutschland, 2013).

- [78] D. Weigel, „Aufbau und Justage eines Mach-Zehnder-Interferometers,“ Zusatzversuch zum Fortgeschrittenen Praktikum, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2008).
- [79] D. Weigel, „Auflösungssteigerung bei optischen Rastermikroskopen mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers,“ Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2010).
- [80] E. Rohr, P. Culmann, S. Czapski, A. König, F. Löwe, H. Siedentopf, und E. Wandersleb, *Die Theorie der optischen Instrumente: I. Band. Die Bilderzeugung in optischen Instrumenten* (Springer-Verlag, 2013).
- [81] S. Mirzaei, N. Kasyanenko, G. Beichert, und E. Reithmeier, „Entwicklung eines neuartigen optomechanischen Bildderotators,“ in „108. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angewandte Optik (DGaO),“ P45 (Heringdorf, Deutschland, 2007).
- [82] K. Wicker, S. Sindbert, und R. Heintzmann, „Characterisation of a resolution enhancing image inversion interferometer,“ *Opt. Express* 17, 15491–15501 (2009).
- [83] M. Erkkilä, „Bildinvertierendes Interferometer,“ Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2012).
- [84] K. Creath, „Phase-measurement interferometry techniques,“ *Prog. Optics* 26, 349–393 (1988).
- [85] J. H. Bruning, D. R. Herriott, J. E. Gallagher, D. P. Rosenfeld, A. D. White, und D. J. Brangaccio, „Digital wavefront measuring interferometer for testing optical surfaces and lenses,“ *Appl. Opt.* 13, 2693–2703 (1974).
- [86] J. C. Wyant, C. L. Koliopoulos, B. Bhushan, und O. E. George, „An optical profilometer for surface characterization of magnetic media,“ *ASLE Trans.* 27, 101–113 (1984).
- [87] J. Schwiegerling, *Optical Specification, Fabrication, and Testing* (SPIE Press, 2014).
- [88] J. C. Wyant, „Interferometric optical metrology - basic principles and new systems,“ *Laser Focus* 18, 65–71 (1982).
- [89] M. Servin und A. Gonzalez, „Linear analysis of the 4-step carré phase shifting algorithm: spectrum, signal-to-noise ratio, and harmonics response,“ *arXiv preprint arXiv:1203.1947* (2012).
- [90] J. Schwider, R. Burow, K.-E. Elssner, J. Grzanna, R. Spolaczyk, und K. Merkel, „Digital wave-front measuring interferometry: some systematic error sources,“ *Appl. Opt.* 22, 3421–3432 (1983).

-
- [91] P. Hariharan, B. Oreb, und T. Eiju, „Digital phase-shifting interferometry: a simple error-compensating phase calculation algorithm,“ *Appl. Opt.* 26, 2504–2506 (1987).
- [92] P. Carré, „Installation et utilisation du comparateur photoélectrique et interférentiel du bureau international des poids et mesures,“ *Metrologia* 2, 13 (1966).
- [93] G. Stoilov und T. Dragostinov, „Phase-stepping interferometry: Five-frame algorithm with an arbitrary step,“ *Opt. Lasers Eng.* 28, 61 – 69 (1997).
- [94] Z. Wang und B. Han, „Advanced iterative algorithm for randomly phase-shifted interferograms with intra- and inter-frame intensity variations,“ *Opt. Lasers Eng.* 45, 274 – 280 (2007).
- [95] P. R. Rao und S. Prakriya, *Signals and systems* (McGraw Hill Education India Private Limited, 2013).
- [96] B. Kern, P. E. Dimotakis, C. Martin, D. B. Lang, und M. Wadsworth, „A high-speed quadrature-phase rotation shearing interferometer for imaging through turbulence,“ in „32nd AIAA Plasmadynamics and Lasers Conference,“ (2001).
- [97] B. Kern, P. E. Dimotakis, C. Martin, D. B. Lang, und R. N. Thessin, „Imaging through turbulence with a quadrature-phase optical interferometer,“ *Appl. Opt.* 44, 7424–7438 (2005).
- [98] R. J. Bell *et al.*, *Introductory Fourier transform spectroscopy* (Academic Press, 1972).
- [99] P. R. Griffiths und J. A. De Haseth, *Fourier transform infrared spectrometry* (John Wiley & Sons, 2007).
- [100] V. Saptari, *Fourier transform spectroscopy instrumentation engineering* (SPIE Press, 2003).
- [101] M. Sasamoto und K. Yoshimori, „Three-dimensional imaging spectrometry by fully passive interferometry,“ *Opt. Rev.* 19, 29–33 (2012).
- [102] W. Demtröder, *Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken* (Springer-Verlag, 2007).
- [103] R. M. Goldstein, H. A. Zebker, und C. L. Werner, „Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping,“ *Radio Sci.* 23, 713–720 (1988).
- [104] D. C. Ghiglia und M. D. Pritt, *Two-dimensional phase unwrapping: theory, algorithms, and software* (Wiley New York, 1998).
- [105] D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Aberration correction in coherence imaging microscopy using an image inverting interferometer,“ *Opt. Express* 23, 20505–20520 (2015).

- [106] E. Menz, „Verbesserung der Schärfentiefe in der Mikroskopie durch ein bildinvertierendes Interferometer,“ Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2016).
- [107] A. A. Wagadarikar, D. L. Marks, K. Choi, R. Horisaki, und D. J. Brady, „Imaging through turbulence using compressive coherence sensing,“ *Opt. Express* 35, 838–840 (2010).
- [108] K. Itoh, T. Inoue, und Y. Ichioka, „Interferometric spectral imaging and optical three-dimensional fourier transformation,“ *Jpn. J. Appl. Phys.* 29, L1561 (1990).
- [109] D. C. Cole, E. Barouch, U. Hollerbach, und S. A. Orszag, „Extending scalar aerial image calculations to higher numerical apertures,“ *J. Vac. Sci. Technol. B* 10, 3037–3041 (1992).
- [110] D. N. Naik, G. Pedrini, und W. Osten, „Recording of incoherent-object hologram as complex spatial coherence function using sagnac radial shearing interferometer and a pockels cell,“ *Opt. Express* 21, 3990–3995 (2013).
- [111] S. W. Hell, G. Reiner, C. Cremer, und E. H. K. Stelzer, „Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index,“ *J. Microsc.* 169, 391–405 (1993).
- [112] P. Török, P. Varga, Z. Laczik, und G. Booker, „Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 12, 325–332 (1995).
- [113] M. J. Booth und T. Wilson, „Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction,“ *J. Biomed. Opt.* 6, 266–272 (2001).
- [114] D.-S. Wan, M. Rajadhyaksha, und R. H. Webb, „Analysis of spherical aberration of a water immersion objective: application to specimens with refractive indices 1.33–1.40,“ *J. Microsc.* 197, 274–284 (2000).
- [115] P. A. Young, S. G. Clendenon, J. M. Byars, R. S. Decca, und K. W. Dunn, „The effects of spherical aberration on multiphoton fluorescence excitation microscopy,“ *J. Microsc.* 242, 157–165 (2011).
- [116] P. Török, P. Varga, und G. Németh, „Analytical solution of the diffraction integrals and interpretation of wave-front distortion when light is focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 12, 2660–2671 (1995).
- [117] M. J. Booth, M. A. A. Neil, und T. Wilson, „Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media,“ *J. Microsc.* 192, 90–98 (1998).

- [118] M. Schwertner, M. J. Booth, T. Tanaka, T. Wilson, und S. Kawata, „Spherical aberration correction system using an adaptive optics deformable mirror,“ *Opt. Commun.* 263, 147–151 (2006).
- [119] P. Kner, J. W. Sedat, D. A. Agrad, und Z. Kam, „High-resolution wide-field microscopy with adaptive optics for spherical aberration correction and motionless focusing,“ *J. Microsc.* 237, 136–147 (2010).
- [120] D. Iwaniuk, P. Rastogi, und E. Hack, „Correcting spherical aberrations induced by an unknown medium through determination of its refractive index and thickness,“ *Opt. Express* 19, 19407–19414 (2011).
- [121] M. Lloyd-Hart und N. M. Milton, „Fundamental limits on isoplanatic correction with multiconjugate adaptive optics,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 20, 1949–1957 (2003).
- [122] P. A. Bedggood, R. Ashman, G. Smith, und A. B. Metha, „Multiconjugate adaptive optics applied to an anatomically accurate human eye model,“ *Opt. Express* 14, 8019–8030 (2006).
- [123] B. Gjonaj, P. Johnson, M. Bonn, und K. F. Domke, „Index mismatch aberration correction over long working distances using spatial light modulation,“ *Appl. Opt.* 51, 8034–8040 (2012).
- [124] P. Török, S. J. Hewlett, und P. Varga, „The role of specimen-induced spherical aberration in confocal microscopy,“ *J. Microsc.* 188, 158–172 (1997).
- [125] M. Schwertner, M. J. Booth, M. A. A. Neil, und T. Wilson, „Measurement of specimen-induced aberrations of biological samples using phase stepping interferometry,“ *J. Microsc.* 213, 11–19 (2004).
- [126] M. Schwertner, M. Booth, und T. Wilson, „Characterizing specimen induced aberrations for high na adaptive optical microscopy,“ *Opt. Express* 12, 6540–6552 (2004).
- [127] M. J. Booth, M. Schwertner, und T. Wilson, „Specimen-induced aberrations and adaptive optics for microscopy,“ *Proc. SPIE*, 589403–589403 (2005).
- [128] M. Schwertner, M. J. Booth, und T. Wilson, „Specimen-induced distortions in light microscopy,“ *J. Microsc.* 228, 97–102 (2007).
- [129] R. Wartmann (Persönliches Gespräch, Jena, 18.02.2016).
- [130] E. J. Candès, J. K. Romberg, und T. Tao, „Stable signal recovery from incomplete and inaccurate measurements,“ *Commun. Pure Appl. Math.* 59, 1207–1223 (2006).
- [131] G. Wechsung, *Vorlesungen zur Komplexitätstheorie*, Band 32 (Springer-Verlag, 2013).
- [132] L. Schermelleh, R. Heintzmann, und H. Leonhardt, „A guide to super-resolution fluorescence microscopy,“ *J. Cell Biol.* 190, 165–175 (2010).

- [133] P. Vermeulen, E. Muro, T. Pons, V. Lorient, und A. Fragola, „Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers,“ *J. Biomed. Opt.* 16, 076019–076019 (2011).
- [134] X. Tao, O. Azucena, M. Fu, Y. Zuo, D. C. Chen, und J. Kubby, „Adaptive optics microscopy with direct wavefront sensing using fluorescent protein guide stars,“ *Opt. Lett.* 36, 3389–3391 (2011).
- [135] M. J. Booth, *Optical and Digital Image Processing: Fundamentals and Applications*, Kapitel: Adaptive Optics in Microscopy, 295–322 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011).
- [136] X. Tao, A. Norton, M. Kissel, O. Azucena, und J. Kubby, „Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars,“ *Opt. Lett.* 38, 5075–5078 (2013).
- [137] D. Weigel, A. Kießling, und R. Kowarschik, „Aberration correction in coherence imaging microscopy,“ in „116. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angewandte Optik (DGaO),“ P16 (Brünn, Tschechische Republik, 2014).
- [138] C. J. R. Sheppard und M. Gu, „Imaging by a high aperture optical system,“ *J. Mod. Opt.* 40, 1631–1651 (1993).
- [139] J. Porter, H. Queener, J. Lin, K. Thorn, und A. A. Awwal, *Adaptive optics for vision science: Principles, practices, design and applications*, Band 171 (John Wiley & Sons, 2006).
- [140] J. Schwiegerling, „Scaling zernike expansion coefficients to different pupil sizes,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 19, 1937–1945 (2002).
- [141] G.-M. Dai, „Scaling zernike expansion coefficients to smaller pupil sizes: a simpler formula,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 23, 539–543 (2006).
- [142] W. Kohn, *Statistik: Datenanalyse und Wahrscheinlichkeitsrechnung* (Springer-Verlag, 2006).
- [143] „Objektive und Okulare für Mikroskop Lg, Ng, Nf, Xk und Xa,“ Datenblatt, VEB Carl Zeiss JENA.
- [144] R. Fucke, K. Kirch, und H. Nickel, *Darstellende Geometrie* (Fachbuchverlag, 1983).
- [145] „Matlab Documentation: fft,“ <http://de.mathworks.com/help/matlab/ref/fft.html> (02.01.2016).
- [146] „RGB-Farbraum,“ <https://de.wikipedia.org/wiki/RGB-Farbraum> (02.01.2016).
- [147] E. F. Glynn, „Spectra,“ <http://www.efg2.com/Lab/ScienceAndEngineering/Spectra.htm> (02.01.2016).

-
- [148] D. Bruton, „Color Science,“ <http://www.midnightkite.com/color.html> (02.01.2016).
- [149] „HSV-Farbraum,“ <https://de.wikipedia.org/wiki/HSV-Farbraum> (02.01.2016).
- [150] B. C. Smith, *Fourier transform infrared spectroscopy* (CRC Press, 1996).
- [151] E. Hering und R. Martin, *Photonik: Grundlagen, Technologie und Anwendung* (Springer-Verlag, 2006).
- [152] T. Yoshizawa, *Handbook of Optical Metrology: Principles and Applications* (CRC Press, 2015).
- [153] S. Lowenthal, J. Serres, und H. Arsenault, „Resolution and film-grain noise in fourier transform holograms recorded with coherent or spatially in coherent light,“ *Opt. Commun.* 1, 438–442 (1970).
- [154] J. Walkup und J. Goodman, „Limitations of fringe-parameter estimation at low light levels,“ *J. Opt. Soc. Am.* 63, 399–407 (1973).
- [155] E. Ribak, C. Roddier, F. Roddier, und J. B. Breckinridge, „Signal-to-noise limitations in white light holography,“ *Appl. Opt.* 27, 1183–1186 (1988).
- [156] K. Itoh, T. Inoue, T. Yoshida, und Y. Ichioka, „Interferometric supermultispectral imaging,“ *Appl. Opt.* 29, 1625–1630 (1990).
- [157] H. Arimoto, K. Yoshimori, und K. Itoh, „Noise-limitations of coherence imaging based on wavefront folding interferometry,“ *Opt. Rev.* 7, 123–128 (2000).
- [158] E. Allen und S. Triantaphillidou, *The Manual of Photography and Digital Imaging* (CRC Press, 2012).
- [159] A. M. Sa, P. C. Carvalho, und L. Velho, *High dynamic range image reconstruction*, Band 2 (Morgan & Claypool Publishers, 2008).
- [160] D. A. Skoog und D. M. West, *Principles of instrumental analysis* (Thomson Brooks/Cole, 2006).
- [161] R. Williams und W. Chang, „Resolution and noise in fourier-transform spectroscopy,“ *J. Opt. Soc. Am.* 56, 167–170 (1966).
- [162] S. T. Thurman und J. R. Fienup, „Signal-to-noise ratio trade-offs associated with coarsely sampled fourier transform spectroscopy,“ *J. Opt. Soc. Am. A* 24, 2817–2821 (2007).
- [163] G. T. Di Francia, „Super-gain antennas and optical resolving power,“ *Il Nuovo Cimento* 9, 426–438 (1952).
- [164] A. Gonzalez, M. Servin, J. Estrada, und H. Rosu, „N-step linear phase-shifting algorithms with optimum signal to noise phase demodulation,“ *J. Mod. Opt.* 58, 1278–1284 (2011).

- [165] Photometrics, *Datenblatt Photometrics Evolve[®] 128 EMCCD* (2015). Rev. A7-12032015.
- [166] Andor Technology Ltd, *Datenblatt ANDOR Apogee Alta F260* (2015). ALTA F260 1215 R1.
- [167] P. König, Allied Vision Technologies GmbH – Support (eMail, 26.04.2016).

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Es waren keine anderen Personen an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlung- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die geltende Promotionsordnung der Physikalisch-Astronomischen Fakultät ist mir bekannt.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt habe und nichts verschwiegen habe.

Jena, 19. Juni 2017

Daniel Weigel

Eigene Publikationen

Buchkapitel

1. D. Weigel, A. Kießling, und R. Kowarschik, „Einsatz der Bildinversionsinterferometrie zur Erhöhung der Auflösung in der konfokalen Mikroskopie,“ Jahrbuch Optik und Feinmechanik 2015, W.-D. Prenzel (Hrsg.) (Görlitz, 2015).

Veröffentlichungen in referierten Fachzeitschriften

1. A. Stark, E. Wong, D. Weigel, H. Babovsky, T. Schott, R. Kowarschik, „Subjective speckle suppression in laser-based stereo photogrammetry,“ Optical Engineering 55, 121713 (2016).
2. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Aberration correction in coherence imaging microscopy using an image inverting interferometer,“ Optics Express 23, 20505-20520 (2015).
3. D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Widefield microscopy with infinite depth of field and enhanced lateral resolution based on an image inverting interferometer,“ Optics Communications 342, 102-108 (2015).
4. D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Imaging properties of different types of microscopes in combination with an image inversion interferometer,“ Optics Communications 332, 301-310 (2014).
5. D. Weigel, H. Jungnickel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Untersuchung des Seheindrucks mittels adaptiver Optik,“ Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde 230, 1199-206 (2013).
6. D. Weigel, T. Elsman, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Combination of the resolution enhancing image inversion microscopy with digital holography,“ Optics Communications 291, 110-115 (2013).
7. H. Jungnickel, D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, R. Kowarschik, und M. Gebhardt, „Just-Noticeable Differences for Wavefront Aberrations Obtained With a Staircase Procedure,“ Journal of Refractive Surgery 29, 102-109 (2013).
8. D. Weigel, R. Förster, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Enhanced resolution of microscopic objects by image inversion interferometry,“ Optics Express 19, 26451-26462 (2011).

9. D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Investigation of the resolution ability of an image inversion interferometer,“ *Optics Communications* 284, 2273-2277 (2011).
10. D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Investigation of the impulse response of an image inversion interferometer,“ *Optics Communications* 283, 368-372 (2010).

Wissenschaftliche Vorträge und Poster

1. A.W. Stark, D. Weigel, H. Babovsky, und R. Kowarschik, „Kontrastunterdrückung subjektiver Speckles zur 3D-Vermessung,“ *Jahrestagung der DGaO e.V.*, B3 (Dresden, Deutschland, 2017).
2. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Microscopy with an infinite depth of field,“ *Jahrestagung der DGaO e.V.*, P31 (Brünn, Tschechische Republik, 2015).
3. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Aberration correction in coherence imaging microscopy,“ *Jahrestagung der DGaO e.V.*, P32 (Brünn, Tschechische Republik, 2015).
4. A.W. Stark, D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Application of the Moiré-effect in digital holography,“ *Jahrestagung der DGaO e.V.*, A6 (Brünn, Tschechische Republik, 2015).
5. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Mikroskopie mit unendlicher Schärfentiefe,“ *Jahrestagung der DGaO e.V.*, A15 (Karlsruhe, Deutschland, 2014).
6. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Einsatz des Bildinversionsverfahrens in der konfokalen Mikroskopie,“ *Jahrestagung der DGaO e.V.*, P16 (Karlsruhe, Deutschland, 2014).
7. J. Buehren, H. Jungnickel, W. Raab, D. Weigel, M. Gebhardt, R. Kowarschik, und T. Kohnen, „Influence of aberration-induced blur on contrast sensitivity: comparison of different optotype sizes,“ *Jahrestagung der ARVO*, 1280 (Seattle, USA, 2013).
8. D. Weigel, A.W. Stark, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Implementation of Image Inversion Microscopy by Using Digital Holography,“ *Fringe 2013*, 149-154 (Nürting, Deutschland, 2013).
9. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Verfahren zur hochauflösten Messung des komplexen Kohärenzgrades,“ *Jahrestagung der DGaO e.V.*, P23 (Braunschweig, Deutschland, 2013).

-
10. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Kombination der digitalen Holografie mit der Bildinversionsmikroskopie,“ Jahrestagung der DGaO e.V., P29 (Braunschweig, Deutschland, 2013).
 11. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Untersuchungen zur Punktbildverwaschungsfunktion in der Bildinversionsmikroskopie,“ Jahrestagung der DGaO e.V., P31 (Braunschweig, Deutschland, 2013).
 12. J. Bühren, H. Jungnickel, W. Raab, D. Weigel, M. Gebhardt, R. Kowarschik, und T. Kohnen, „Die Auswirkung der Optotypengröße auf die Beeinflussung der Kontrastempfindlichkeit durch Wellenfrontaberrationen höherer Ordnung,“ 27. Kongress der DGJJ, 049 (Heidelberg, Deutschland, 2013).
 13. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Simulation of higher order aberrations using adaptive optics,“ Jahrestagung der DGaO e.V., P41 (Eindhoven, Niederlande, 2012).
 14. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Characterization of the deformable mirror Mirao 52e,“ Jahrestagung der DGaO e.V., P42 (Eindhoven, Niederlande, 2012).
 15. H. Jungnickel, C. Czok, D. Weigel, A. Kiessling, R. Kowarschik, und M. Gebhardt, „Determination of Just-Noticeable Values of Coma and Trefoil Induced by Adaptive Optics,“ Jahrestagung der ARVO, 2806 (Vancouver, Kanada, 2011).
 16. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Measurement and corrections of aberrations of the human eye by an adaptive optical system,“ DokDok 2011, 140-141 (Naumburg, Deutschland, 2011).
 17. D. Weigel, R. Förster, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Interferometrische Steigerung des Auflösungsvermögens optischer Rastermikroskope,“ Jahrestagung der DGaO e.V., B35 (Ilmenau, Deutschland, 2011).
 18. D. Weigel, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Auflösungssteigerung bei optischen Rastermikroskopen mit Hilfe eines bildinvertierenden Interferometers,“ Jahrestagung der DGaO e.V., P8 (Wetzlar, Deutschland, 2010).
 19. D. Weigel, H. Babovsky, A. Kiessling, und R. Kowarschik, „Improvement of the resolution in optical imaging systems by interference of against each other inverted image fields,“ Jahrestagung der DGaO e.V., A24 (Brescia, Italien, 2009).

Danksagung

Am Ende meiner Arbeit ist es mir eine große Freude, all den Menschen zu danken, die mich in den vergangenen Jahren betreut, unterstützt und begleitet haben. Hierbei möchte ich besonders Prof. Dr. Richard Kowarschik danken. Er hat mich von meinen ersten Physikvorlesungen an, über sehr interessante Zusatzvorlesungen, den Zusatzversuch des Fortgeschrittenenpraktikums sowie die Diplomarbeit hinweg bis hin zur Promotion begleitet. Sein analytisches Denken sowie seine Fähigkeit, Problemstellungen präzise zu formulieren und effektiv zu lösen, haben meine Art und Weise des wissenschaftlichen Arbeitens entscheidend geprägt. Ich möchte ihm dafür danken, dass ich meine Promotion am Institut für Angewandte Optik durchführen konnte. Er hatte für mich immer ein offenes Ohr und zahlreiche wertvolle Ratschläge.

Nicht weniger möchte ich mich bei Dr. Armin Kießling bedanken. Schon als Übungsleiter im Studium ist es ihm gelungen, die anspruchsvollen Inhalte so mancher Vorlesung verständlich aufzuarbeiten und einprägsam zu vermitteln. Während meiner Promotion habe ich ihn als hervorragenden und engagierten Wissenschaftler und Betreuer kennengelernt. Erst aufgrund der zahlreichen Diskussionen mit ihm ist es mir gelungen, verschiedene Fragestellungen erfolgreich zu bearbeiten. Ich habe von ihm viel gelernt und bin sehr dankbar für seine Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen Kollegen bedanken, welche direkt oder indirekt zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben. Ich kann mich an viele interessante Gespräche erinnern, welche mich und meine Arbeit vorangebracht haben. Hierbei denke ich besonders an M.Sc. Mikael Erkkilä, mit dem ich zu Beginn meiner Promotion viele spannende Diskussionen führte.

Ohne die engagierte Hilfe von Herrn Dipl. Ing. (FH) Thomas Schott wäre der ein oder andere Versuchsaufbau in den vergangenen Jahren nicht möglich gewesen. Durch das Erstellen diverser elektronischer Schaltungen ermöglichte er in vielen Fällen eine reibungslose Messwertaufnahme. Ähnliches gilt für die Kollegen aus der Feinmechanikwerkstatt. Durch die passgenaue Anfertigung zahlreicher Bauelemente haben auch sie maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ein besonderer Dank gilt dabei Herrn Peter Hanse und Herrn Stephan Eiweleit.

Des Weiteren danke ich der Carl Zeiss Microscopy GmbH für die Unterstützung meiner Forschung. Insbesondere möchte ich hier Dr. Rolf Wartmann und Herrn Heinrich Bunger erwähnen. Aufgrund ihres Interesses an meiner Arbeit und ihres Engagements wurden mir unter anderem mehrere hochwertige Mikroskopobjektive sowie das Modell des Eiffelturms leihweise zur Verfügung gestellt.

Ferner gilt mein Dank Dr. Wolfgang Vollrath und der KLA-Tencor MIE GmbH. Auch sie haben meine Forschung durch diverse Leihgaben unterstützt.

Ich möchte mich zudem bei der Abbe School of Photonics bedanken, welche mich im ersten Teil meiner Promotion durch ein Stipendium finanziert hat. Im zweiten Teil war ich Angestellter der Friedrich-Schiller Universität Jena und wurde daher auch aus Steuergeldern finanziert. Ich möchte mich daher aufrichtig bei jedem Mitbürger bedanken, der durch seine Abgaben Forschung und Fortschritt erst ermöglicht.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie für die liebevolle Unterstützung in den vergangenen Jahren bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei meiner Frau Silvia. Sie hat so manchen Rechtschreibe- und Grammatikfehler aufgespürt und korrigiert. Noch viel wichtiger ist jedoch, dass sie mich mit unglaublich viel Geduld, Verständnis und Liebe durch diese oft auch schwere Zeit getragen hat. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich liebe dich!